

Aus dem Institut für medizinischen Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung zur
Selektivität versus Promiskuität
ausgewählter SH3-Domänen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von
Christoph Dröseler
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
 2. Prof. Dr. med. Th. Kamradt
 3. Prof. Dr. E. Schneider

Datum der Promotion: 21.11.2005

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	10
Summary	11
1 Einleitung	13
1.1 Überblick	13
1.2 SH3-Domäne als Beispiel einer Protein-Interaktions-Domäne	13
1.3 Selektivität und Promiskuität; Regulationsmechanismen in der Zelle	18
1.4 Untersuchte SH3-Domänen	21
1.5 Medizinische Zusammenhänge	22
1.5.1 <i>Malaria und Tuberkulose</i>	22
1.5.2 <i>Amphiphysin I</i>	23
1.5.3 <i>AmphiphysinII/ BIN1</i>	23
2 Thema	23
3 Materialien/ Methoden	24
3.1 Die SPOT-Technologie: chemischer Teil	24
3.1.1 <i>Praktische Durchführung der SPOT-Synthese</i>	26
3.1.2 <i>Eingesetzte WISE-Arrays</i>	29
3.2 Die SPOT-Technologie: Screening-Teil	30
3.2.1 <i>Praktische Durchführung des Screening-Teils der SH3-Peptid-Bindungsstudie</i>	31
3.2.2 <i>Regenerierung der CAPE-Membran</i>	32
3.3 Standard-Festphasenpeptidsynthese	33
3.4 BIAcore/ Surface Plasmon Resonance	35
3.4.1 <i>Theoretische Betrachtung</i>	36
3.4.2 <i>BIAcore: praktische Durchführung</i>	37
3.5 Verwendete Geräte	39
3.6 Verwendete Software:	40
3.7 Chemikalien	40
3.7.1 <i>Reagenzien für die Spotsynthese</i>	40
3.7.2 <i>Reagenzien für die BIAcore®X</i>	41
3.8 Datenauswertung	41
3.9 Grenzwertbestimmung	42
4 Ergebnisse	43
4.1 Analyse der Ligand-SH3-Domäneninteraktion	43
4.1.1 <i>SH3-Domänen von Myo5 und Abp1</i>	43
4.1.2 <i>SH3-Domänen von Rvs167 und Yhr016</i>	45
4.1.3 <i>Gesamtauswertung der vier Screeningarrays</i>	47
4.2 Charakterisierung der ausgewählten Liganden der vier SH3-Domänen	48
4.2.1 <i>ERP KRRAPPPV P K K P als Myo5-SH3-Domänenligand</i>	49
4.2.2 <i>ERP KRRAPPPV P K K P als Abp1-SH3-Domänenligand</i>	51
4.2.3 <i>Zusammenfassung der Charakterisierung von ERP KRRAPPPV P K K P</i>	53
4.2.4 <i>VQQDSL P K L P F R S W G als Rvs167-SH3-Domänenligand</i>	54
4.2.5 <i>VQQDSL P K L P F R S W G als Yhr016-SH3-Domänenligand</i>	55
4.2.6 <i>Zusammenfassung der Charakterisierung von VQQDSL P K L P F R S W G</i>	57
4.3 Regenerierung der CAPE-Membran	57
5 Diskussion	59
5.1 Bewertung der WISE-Arrays	59
5.2 Bewertung der Peptid-Protein-Bindungen	62
5.3 Regenerierung	68
6 Ausblick	68
Anhang	70
Literaturverzeichnis	76
Lebenslauf	79
Danksagung	80
Erklärung	80

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: **Schematische Darstellung der SH3-Domäne Abp1:** rot/ blau: β -Faltblätter, grün: Helix, zyan: N-Src-Loop, pink: RT-Loop, grau: distaler Loop und gelb: Aminosäuren, welche die Bindungstasche ausbilden 14

Abb. 2: **A) Struktur und Bindungsmechanismus einer SH3-Domäne:** Dargestellt ist die SH3-Domäne von Sem5, die einen Polyprolinliganden bindet. **B) Darstellung der Bindungsoberfläche von Sem-SH3, in der ein Ligand bindet:** Die Bindungsoberfläche der Domäne besteht aus drei Taschen (grün und gelb gekennzeichnet). Hier wird der prolinhaltige Ligand (in schwarz dargestellt) erkannt. Weiter ist die schematisch-räumlich und trianguläre Struktur des Liganden (PPII-Helix) zu erkennen. **Grün** stellt sich die spezifische Bindungstasche dar, die mit den basischen Aminosäureresten interagiert. **Gelb** stellen sich die zwei konservierten aromatischen Taschen dar, die mit der xP-Sequenz des Liganden interagieren. 15

Abb. 3: **Schematische Darstellung der Ligandenbindungsmöglichkeit einer SH3-Domäne:** Gezeigt wird eine SH3-Domäne, die einen Klasse-1-Liganden bzw. einen Klasse-2-Liganden binden kann. In beiden Abbildungen ist ausgehend vom Liganden links der RT-Loop und rechts der n-Src-Loop. Die Orientierung des Klasse-1-Ligand vom N- zum C-Terminus in der Bindungstasche ist auf der linken Seite zu sehen, und die des Klasse-2-Liganden in der gleichen Tasche von C- zum N-Terminus auf der rechten Seite zu sehen ist. Die Liganden unterscheiden sich nur in einer Rotation von 180° in der Vertikalen. Beim Klasse-1-Liganden zeigen die Prolinreste des PxxP-Motivs zum RT-Loop und beim Klasse-2-Liganden zum n-Src-Loop. Die Positionen der zwei unspezifischen Taschen und der spezifischen Tasche bleiben konstant. 17

Abb. 4: **Ausschnitt eines SH3-Proteinnetzwerkes in *Saccharomyces cerevisiae*:** Die Farben der Linien entsprechen den einzelnen Interaktionen zwischen den Proteinen, die durch SH3-Domänen vermittelt wurden. Der Durchmesser der Linien ist proportional zu den gemessenen Signalintensitäten der jeweiligen Bindung. Fett unterstrichen sind die vier näher zu charakterisierenden SH3-Domänen von Myo5 (rot), Abp1 (blau), Rvs167 (hellblau) und Yhr016 (pink). 19

Abb. 5: **Modell: Rolle der negativen Selektion für ein spezifisches Interaktionsnetzwerk: a)** Das PxxP-Motiv von Pbs2 (gekennzeichnet mit einem X) wird neben Sho1-SH3 von SH3-Domänen anderer Spezies erkannt. Die Interaktion zwischen den SH3-Domänen und dem Pbs2-Motiv ist promiskuitiv, da die Erkennungsprofile (rote und graue Kreise) für diesen Liganden überlappen. **b)** Das Pbs2-Motiv (gekennzeichnet mit einem X) ist in der Hefe einzigartig. Das Motiv liegt nur im Erkennungsprofil (rote und graue Kreise) von Sho1-SH3. Es ist hoch selektiv für Sho1-SH3. 20

Abb. 6: **Grundprinzip SPOT-Verfahren zur Peptidsynthese auf Cellulosemembranen:** 26

Abb. 7: **Zusammenfassung des praktischen Ablaufes der Spotsynthese** 29

Abb. 8: **Schematische Darstellung WISE-Technik:** 30

Abb. 9: **Chromatogramme der Liganden ERPKRRAPPPVPKKP (SH3-Abp1 und -Myo5) und VQQDSLPLKLPFRSWG (SH3-Rvs167 und -Yhr016) in der analytischen HPLC:** 35

Abb. 10: **Massenspektren (MALDI-TOF) der Liganden ERPKRRAPPPVPKKP (SH3-Abp1 und -Myo5) und VQQDSLPLKLPFRSWG (SH3-Rvs167 und -Yhr016):** Das Molekulargewicht der einzelnen Liganden ist in der Abbildung als unterstrichener Wert dargestellt. ERPKRRAPPPVPKKP bei 1753,57 g/mol (soll 1753,08 g/mol) und VQQDSLPLKLPFRSWG bei 1757,42 g/mol (soll 1757,97 g/mol) 35

Abb. 11: **Aufbau des CM5-Chips und Aufbau des Meßsystems: Linke Graphik:** Aufbau des Sensorchips, Dextranmatrix (blau-orange), Goldschicht (gold), Glas (hellblau) **Rechte Graphik:** Aufbau des Meßsystems Flusskanal (schwarzumrandet), Sensorchip (hellblau-gelb), SPR-Detektor (orange) bestehend aus Lichtquelle und dem Sensor. Der Detektor befindet sich auf der Glasseite. 36

Abb. 12: **Schematische Darstellung der Modifizierungsmöglichkeiten der carboxymehylierten Dextranmatrix:** 37

Abb. 13: **Schematische Darstellung eines Sensorgrams:** a) Basislinie im Pufferfluss, b) Probeninjektion, Bindung und Signalanstieg, c) Dissoziation, Signalabfall im anschließenden Pufferfluss, d) Regenerierung und entsprechende Basislinie, die Kästchen zeigen die Beladung des Sensorchips 39

Abb. 14: **Darstellung des Screeningarrays der Myo-SH3-Domäne: Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Peptidbibliothek mit 2953 15-meren-Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) hergestellt und auf Bindung mit zur Myo5-SH3-Domäne analysiert. Die sichtbaren Spots zeigen eine Interaktion zur jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom

Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **oranger Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum. 44

Abb. 15: **Darstellung des Screeningarrays der Abp1-SH3-Domäne:** **Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Peptidbibliothek mit 2953 15-meren-Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) hergestellt und auf Bindung mit zur Abp1-SH3-Domäne analysiert. Die sichtbaren Spots zeigen eine Interaktion zur jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **oranger Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum. 44

Abb. 16: **Darstellung des Screeningarrays der Rvs167-SH3-Domäne:** **Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Peptidbibliothek mit 2953 15-meren-Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) hergestellt und auf Bindung mit zur Rvs167-SH3-Domäne analysiert. Die sichtbaren Spots zeigen eine Interaktion zur jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **oranger Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum. 46

Abb. 17: **Darstellung des Screeningarrays der Yhr016-SH3-Domäne:** **Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Peptidbibliothek mit 2953 15-meren-Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) hergestellt und auf Bindung mit zur Yhr016-SH3-Domäne analysiert. Die sichtbaren Spots zeigen eine Interaktion zur jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **oranger Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum. 46

Abb. 18: **Vergleich der SI (Mean) der gesamten SH3-Domänenarrays:** Vergleich der Selektivitäten anhand der Flächen unter den jeweiligen Graphen der SH3-Domänen von **Myo5 (orange)**, **Abp1 (blau)**, **Yhr016 (grün)** und **Rvs167 (pink)**. Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden von Maximum zu Minimum geordnet, normalisiert und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide aufgetragen. 48

Abb. 19: **Darstellung der Substitutions-/ Längenanalyse nach der Auswertung im Lumi-Imager und graphische Darstellung der Affinität zwischen Ligand und Myo5-SH3:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurden die Membranen erstellt. Nach der Inkubation mit der jeweiligen Domäne und dem Antikörperset stellten sich nach der Auswertung die abgebildeten Muster dar. **Linke Abbildung:** Substitutionsanalyse (obere Fläche): In der ersten Spalte wurde der Wildtyp (wt) synthetisiert. Jede Aminosäure des Liganden wurde durch 19 L-Aminosäuren ersetzt (außer C) damit jene Schlüsselaminosäuren erkannt werden. **Längenanalyse** (untere Fläche): Der Ligand wurde nacheinander N- und C-terminal bis auf eine Länge von 5 Aminosäureresten gekürzt. **Rechte Abbildung:** Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Resonanzunit zur gegebenen molaren Konzentration: blaue Vierecke: sind die Signale zu der jeweiligen Konzentration, orange Linie: gemittelter Graph zwischen den einzelnen Signalen. Der KD-Wert wird unter zu Hilfenahme des Programms BIAevaluation aus den abgebildeten Werten errechnet (siehe ab 3.4). 50

Abb. 20: **Darstellung der Substitutions-/ Längenanalyse nach der Auswertung im Lumi-Imager und graphische Darstellung der Affinität zwischen Ligand und Abp1-SH3:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurden die Membranen erstellt. Nach der Inkubation mit der jeweiligen Domäne und dem Antikörperset stellten sich nach der Auswertung die abgebildeten Muster dar. **Linke Abbildung:** Substitutionsanalyse (obere Fläche): In der ersten Spalte wurde der Wildtyp (wt) synthetisiert. Jede Aminosäure des Liganden wurde durch 19 L-Aminosäuren ersetzt (außer C) damit konnten Schlüsselaminosäuren erkannt werden. **Längenanalyse** (untere Fläche): Der Ligand wurde nacheinander N- und C-terminal bis auf eine Länge von 5 Aminosäureresten gekürzt. **Rechte Abbildung:** Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Resonanzunit zur gegebenen molaren Konzentration: blaue Vierecke: sind die Signale zu der jeweiligen Konzentration, blaue Linie: gemittelter Graph zwischen den einzelnen Signalen. Der KD-Wert wird unter zu Hilfenahme des Programms BIAevaluation aus den abgebildeten Werten errechnet (siehe ab 3.4). 52

Abb. 21: **Darstellung der Substitutions-/ Längenanalyse nach der Auswertung im Lumi-Imager und graphische Darstellung der Affinität zwischen Ligand und SH3-Domäne:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurden die Membranen erstellt. Nach der Inkubation mit der

jeweiligen Domäne und dem Antikörperset, stellten sich nach der Auswertung die abgebildeten Muster dar. **Linke Abbildung: Substitutionsanalyse** (obere Fläche): In der ersten Spalte wurde der Wildtyp (wt) synthetisiert. Jede Aminosäure des Liganden wurde durch 19 L-Aminosäuren ersetzt (außer C) damit konnten Schlüsselaminosäuren erkannt werden. **Längenanalyse** (untere Fläche): Der Ligand wurde nacheinander N- und C-terminal bis auf eine Länge von 5 Aminosäureresten gekürzt. **Rechte Abbildung:** Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Resonanzunit zur gegebenen molaren Konzentration: blaue Vierecke: sind die Signale zu der jeweiligen Konzentration, pinke Linie: gemittelter Graph zwischen den einzelnen Signalen. Der KD-Wert wird unter zu Hilfenahme des Programms BIAevaluation aus den abgebildeten Werten errechnet (siehe ab 3.4). 55

Abb. 22: **Darstellung der Substitutions-/ Längenanalyse nach der Auswertung im Lumi-Imager und graphische Darstellung der Affinität zwischen Ligand und SH3-Domäne:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurden die Membranen erstellt. Nach der Inkubation mit der jeweiligen Domäne und dem Antikörperset stellten sich nach der Auswertung die abgebildeten Muster dar. **Linke Abbildung: Substitutionsanalyse** (obere Fläche): In der ersten Spalte wurde der Wildtyp (wt) synthetisiert. Jede Aminosäure des Liganden wurde durch 19 L-Aminosäuren ersetzt (außer C) damit konnten Schlüsselaminosäuren erkannt werden. **Längenanalyse** (untere Fläche): Der Ligand wurde nacheinander N- und C-terminal bis auf eine Länge von 5 Aminosäureresten gekürzt. **Rechte Abbildung:** Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Resonanzunit zur gegebenen molaren Konzentration: blaue Vierecke: sind die Signale zu der jeweiligen Konzentration, grüne Linie: gemittelter Graph zwischen den einzelnen Signalen. Der KD-Wert wird unter zu Hilfenahme des Programms BIAevaluation aus den abgebildeten Werten errechnet (siehe ab 3.4). 56

Abb. 23: **Darstellung des Screeningarrays von Abp1-SH3 (CAPE-Membran) nach der Auswertung im Lumi-Imager und die graphische Darstellung aller Mean des Screeningarrays:** **Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Proteinbibliothek mit 2953 Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) mit einer Länge von 15 Aminosäure hergestellt. Die sichtbaren Spots (punktförmige Abbildungen) zeigen eine Interaktion mit der jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **blauer Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum 58

Abb. 24: **Darstellung des Screeningarrays von Abp1-SH3 (CAPE-Membran) nach der Auswertung im Lumi-Imager und die graphische Darstellung aller Mean des Screeningarrays:** **Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Proteinbibliothek mit 2953 Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) mit einer Länge von 15 Aminosäure hergestellt. Die sichtbaren Spots (punktförmige Abbildungen) zeigen eine Interaktion mit der jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **roter Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum 58

Abb. 25: **Signalintensitäten (Mean) der SH3-Abp1-Domänenarrays vor und nach der Regeneration:** Vergleich der Signalintensitäten vor der Regenerierung (blauer Graph) und nach der Regenerierung (roter Graph). Die Mean-Werte wurden gegen den Peptidindex (siehe Abb.24) aufgetragen. 59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Charakterisierung der ausgewählten SH3-Domänen	21
Tab. 2: Ansatz zur Derivatisation der Zellulose.....	26
Tab. 3: Ansatz zur Bildung der primären Amidgruppe.....	27
Tab. 4: Schutzgruppen der Aminosäuren.....	28
Tab. 5: Abspaltung 1.....	29
Tab. 6: Abspaltung 2.....	29
Tab. 7: Zusammensetzung des Blocking Buffer (BB).....	31
Tab. 8: 1. Antikörperendkonzentration in BB.....	31
Tab. 9: 2. Antikörperendkonzentration in BB.....	32
Tab. 10: Bestandteile der Luminol/ enhancer solution.....	32
Tab. 11: Zusammensetzung des Zitratpuffers	33
Tab. 12: Geräte.....	39
Tab. 13: Software.....	40
Tab. 14: Auflistung aller verwendeten Aminosäuren	40
Tab. 15: GST-Capturekit der Firma BIACORE.....	41
Tab. 16: Konzentrationen der SH3-Fusionsproteine.....	41
Tab. 17: HBS-Puffer BIA <i>Certified</i> der Firma BIACORE	41
Tab. 18: Zusammenfassung	47
Tab. 19: Beschreibung des Konsensusmotivs mit ASCII	48
Tab. 20: Zusammenfassung der Charakterisierung von ERPKRRAPPPVPPKKP	53
Tab. 21: Zusammenfassung der Charakterisierung von VQQDSLPLPFRSWG	57
Tab. 22: Gesamtzusammenfassung.....	67
Tab. 23: Datensatz Abp1-SH3	70
Tab. 24: Datensatz Myo5-SH3.....	70
Tab. 25: Datensatz Rvs167-SH3	71
Tab. 26: Datensatz Yhr016-SH3	72
Tab. 27: Datensatz Regenerierung Abp1-SH3.....	72
Tab. 28: Datensammlung Markierungspeptide von SH3-Domänen Abp1, Myo5, Rvs167, Yhr016	73
Tab. 29: Längenanalyse: Ligand: ERPKRRAPPPVPPKKP Myo5-SH3/ Abp1-SH3	73
Tab. 30: Längenanalyse: Ligand: VQQDSLPLPFRSWG Rvs167-SH3/ Yhr016-SH3	74
Tab. 31: Korrespondierende Liganden von Abp1-/ Myo5-SH3 und Rvs167-/ Yhr016-SH3	74
Tab. 32: Puffer für die Regenerierung	74

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
AB	Antibiotikum
Abp1	Aktinbindendes Protein 1
AS	Aminosäure
BB	Engl. Blockierungspuffer
CAPE	Cellulose- (3-amino-2-hydroxy-propyl)-ether
C-Atom	Kohlenstoffatom/ -atome
CM5	Carboxymethyl modifizierter dextranbeschichteter Chip
Crk	gesprochen "creck", Adapterprotein im Src-Tyrosinkinase-Oncoprotein
DCM	Dichlormethan
DIPA	N-Ethyl-Diisopropylamin
DMA	Dimethylacetamid
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carboimide
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
GST	Glutathion-S-Transferase
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazidin-N-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IgG	Immunglobulin G
KD	Konzentration bei halber Sättigung
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/ Ionisation
MAP-Kinase	Engl. zellteilungaktivierende-Kinase
MeOH	Methanol
MPS	Multipler Peptidsynthesizer
Myo3 und 5	Myosin-Isoform 3 und 5
Na	Natrium
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	1-Methyl-2-Pyrrolidon
ODhbt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotranzine
OPfp	ortho-Pentafluorphenyl
ORS	Engl. Ungewöhnliche Erkennungsspezifität
POD	Peroxidase
PPII	Polyprolin 2-Helix
PSMS	paraneoplastisches Stiff-man-Syndrom
PTS	para-Toluolsulfonsäure
PxxP	P Prolin, x-beliebige AS
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RU	Resonanzunit, Einheit von BIAevaluation
RVS167	reduced viability upon starvation protein 167
Sla1	Synthetic lethal Abp1
Src	Gencode im Rous Sarkom Virusgenom, kodiert für eine Src-Kinase
SRP	Engl. Oberflächenplasmonen-Resonanz
TBS	Engl. Tris buffered Saline
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisobutylsilan
TRIS	Tris-hydroxymethylaminomethan
Vrp	Verprolin
WISE-Strategy	Engl. Auffinden aller Bindungspartner einer Domäne über orthogonale Screeningverfahren
wt	Wildtyp
Yhr016	Hypothetical 41,8 kDa Protein in SPO13-ARG4 intergenic region
xP-Dipeptid	x für hydrophobe AS, P für Prolin

Abkürzung	Bezeichnung des Einbuchstabenkodes der Aminosäuren
A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
Symbole ASCII	Beschreibung
x	beliebige Aminosäure (AS)
%	hydrophobe AS
@	aromatische AS
&	hydrophile AS
[+]	positiv geladene AS
[-]	negativ geladene AS
#	aliphatische AS

Zusammenfassung

SH3-Domänen sind Proteinmodule, die über die Erkennung prolinreicher Peptidsequenzen Protein-Protein-Interaktionen in einer Vielzahl von zellulären Prozessen vermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde die Erkennung von Peptidliganden durch ausgewählte SH3-Domänen hinsichtlich Selektivität versus Promiskuität untersucht. Diese Arbeiten dienten als Vorversuche für einen kompletten proteomischen Ansatz aller SH3-Domänen aus *S. cerevisiae*.

Für die vier ausgewählten SH3-Domänen, nämlich Myo5, Abp1, Yhr016 und Rvs167, wurden die Ligandenpräferenzen durch Interaktionsanalysen mit einem vollständigen Satz prolinreichen Peptidliganden, abgeleitet aus dem Hefe-proteom ermittelt. Hierzu wurde ein Peptid-Array Ansatz gewählt. Mit der SPOT-Technologie wurden 2953 15-mere Peptide als Array auf einem Celluloseträger Schritt für Schritt synthetisiert. Hierfür wurde zuerst die Art des Celluloseträgers festgelegt und anschließend überprüft, ob sich ein Array mehrmals in Interaktionsexperimenten verwenden lässt. Es zeigte sich, dass eine Regeneration der Arrays nicht möglich war, so dass für jedes Interaktions-experiment ein neues Peptidarray synthetisiert werden musste.

Die Interaktionsstudien bestätigten die Bindung prolinreicher Sequenzmotive als eine universelle Eigenschaft der vier SH3-Domänen, wobei die einzelnen SH3-Domänen-Peptid-Interaktionen von zusätzlichen, spezifitätsdeterminierenden Resten im Liganden abhängig waren. Darüber hinaus zeigten die Experimente deutliche Unterschiede hinsichtlich Selektivität und Promiskuität im Erkennungsverhalten der vier Domänen. Die Domänen konnten nach steigender Selektivität an Hand der Bestimmung von Grenzwerten und Integralen geordnet werden, nämlich $\text{Myo5} < \text{Abp1} < \text{Yhr016} < \text{Rvs167}$. Ein gemeinsamer Ligand für alle vier Domänen konnte nicht identifiziert werden. Dagegen konnten gemeinsame Liganden für die Domänenpaare Myo5/Abp1 und Yhr016/Rvs167 bestimmt werden. Die Bindungspräferenzen zweier ausgewählter Liganden, dem Myo5/Abp1 Liganden ERPKRRAPPPAPKKP und dem Yhr016/Rvs167 Liganden VQQDSLPLKLPFRSWG, wurden mit Hilfe von Substitutions- und Längenanalysen detailliert charakterisiert. Es zeigte sich deutlich, dass die selektiveren SH3-Domänen Yhr016 und Rvs167 einen klar definierten und kurzen Konsensus im Liganden binden, hingegen die mehr promiskuitiven Domänen Myo5 und Abp1 ein stärker variables und längeres Motiv im Liganden

erkennen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die hier gewählte Methode geeignet ist, die proteomische Charakterisierung aller dreißig Hefe SH3-Domänen in Angriff zu nehmen

Schlagwörter: SH3-Domänen, Selektivität, Promiskuität, Myo5, Abp1, Yhr016, Rvs167, SPOT-Synthese

Summary

SH3-Domains are protein modules, which recognize polyproline sequences. The Domains are involved in a variety of cellular processes. The recognition rules between peptide ligands and selected SH3-Domains were analysed in respect of selectivity versus promiscuity. This dissertation is a preliminary test for subsequent scanning the whole number of yeast SH3-Domains.

The SH3-Domains Myo5, Abp1, Yhr016 and Rvs167 were selected and chosen for interaction with all yeast polyproline ligands. A peptide array was chosen and built up with SPOT-Synthesis. 2953 15-mer peptides were spotted as an array on a cellulose membrane and inspected for regeneration method. The regeneration failed and therefore four arrays were synthesised.

The scanning experiments revealed an interaction between Ligand and Domain with a common polyproline core. However, these experiments demonstrated as well that specific residues were needed for operative ligand domain interaction. In addition, these four SH3-Domains exhibited clear differences in selectivity and promiscuity of recognition profiles. The integrals and the results after the setting of the threshold showed a distinct increase in selectivity. The arrangement was based on the increasing selectivity: **1. Myo5 2. Abp1 3.** but cases of consistency were found between Abp1- and Myo5-SH3, as well as ligands between Yhr16- and Rvs167-SH3. The Myo5-/Abp1-Ligand ERPKRRAPPPAPKKP and the Yhr016-/Rvs167 ligand VQQDSLPLKLPFRSWG were selected for characterisation of the peptide domain interaction through the analysis of substitution and length. The data showed that more selective Domains like Yhr016 and Rvs167 had a well-defined and short consensus, whereas more promiscuous Domains like Yhr016 and Rvs167 showed a mutable and longer consensus.

In conclusion, the data showed that the SPOT-Synthesis is a suitable technique for a proteomic characterisation of the whole 30 yeast SH3-Domains.

Keywords: SH3-Domains, Selectivity, Promiscuity, Myo5, Abp1, Yhr016, Rvs167, SPOT-Synthesis

1 Einleitung

1.1 Überblick

Die Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ist ein Standardorganismus für biologische Untersuchungen an eukaryoten Zellen. Dieser Mikroorganismus ist leicht zu kultivieren. Sein Genom ist vollständig sequenziert und besteht aus ca. 6000 Open Reading Frames (*ORF, proteinkodierender Bereich der DNA*), die für eine Anzahl von unterschiedlichsten Proteinen kodieren. Die exprimierten Genprodukte, die Proteine, sind an unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt. Die Interaktionen von Proteinen werden durch eine Vielzahl von im Protein auftretenden Modulen, den Domänen, vermittelt. Die Domänen können dabei katalytische und nichtkatalytische Funktion ausüben (1). Eine Schlüssel-funktion bei den Proteininteraktionen nehmen dabei nichtkatalytische Domänen ein, wie z.B. die SH3-Domänen (*Src-Homologie 3*) (2) (3).

Proteindomänen bilden eine strukturelle und funktionelle Einheit. Sie werden über Exon Shuffling im Proteom integriert und verleihen erst den Proteinen eine Funktion (4). Entdeckt wurden diese Einheiten durch das gehäufte Auftreten von konservierten Bereichen innerhalb von verschiedenen Proteinen. Eine der bedeutenden Aufgaben ist die Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, welche wichtige biologische Prozesse wie z.B. in der Aktinorganisation, Endozytose, Kontrolle der Osmolarität und im Splicevorgang steuern. Ihre Größe variiert zwischen 35 und 100 Aminosäuren und ihre Anzahl korreliert mit der Entwicklungsstufe des Organismus (5). Im Allgemeinen gilt; je höher ein Organismus entwickelt ist, desto größer ist die Zahl der Domänen.

Zu den ubiquitär vorkommenden Domänen gehört unter anderem die nichtkatalytische SH3-Domäne, die in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wird. Vier SH3-Domänen aus der Bäckerhefe werden im Rahmen der Arbeit auf Selektivität/ Promiskuität untersucht, und ihre Liganden werden näher charakterisiert.

1.2 SH3-Domäne als Beispiel einer Protein-Interaktions-Domäne

Die SH3-Domäne wurde erstmals als eine Region von Sequenzwiederholungen im Crk-Adapterprotein der Src-Tyrosinkinasefamilie beschrieben (6). Die

Bezeichnung Src leitet sich von dem Gennamen v-Src der Tyrosinkinase des Rous-Sarkom-Retrovirus ab. Es handelt sich um ein Oncogen, das im Huhn mesenchymale Entartungen hervorruft. Das Crk-Protein (*gesprochen "creck"*) zählt zu den potentiellen Oncoproteinen. Es besteht aus einer SH2- und SH3-Domäne sowie einer katalytischen Einheit (7). Aus dieser Beschreibung resultierte die Abkürzung SH3 für sequenzhomologe Region 3.

Die Anzahl dieser Domänen kann in einem Protein zwischen einer und bis zu drei variieren z.B. bei den Hefeproteinen Abp1 (*eine Domäne*) und Sla1 (*drei Domänen*) (4) (8) (9) (10). SH3-Domänen spielen eine große Rolle in den Mechanismen der Endozytose, Signaltransduktion, Aktinorganisation und im intrazellulären Membrantransportsystem (4).

Die SH3-Domäne besteht aus circa 60 Aminosäureresten und ist aufgebaut aus zwei senkrecht zu einander stehenden, antiparallel verlaufenden β -Faltblättern, die über Loops miteinander verbunden sind (Abb. 1). Die β -Faltblätter können auch über Helices verbunden sein. Ein β -Faltblatt besteht aus zwei bis drei β -Strängen. Es werden drei verschiedene Loops unterschieden: der n-Src-Loop, RT-Loop und der distale Loop (4). Die Loops unterscheiden sich zwischen den verschiedenen SH3-Domänen in Länge und in einzelnen Aminosäureresten (11).



Abb. 1: Schematische Darstellung der SH3-Domäne Abp1: rot/ blau: β -Faltblätter, grün: Helix, zyan: N-Src-Loop, pink: RT-Loop, grau: distaler Loop und gelb: Aminosäuren, welche die Bindungstasche ausbilden

Zwischen dem n-Src-Loop und dem RT-Loop liegt ein relativ flacher und hydrophober Bereich, der aus konservierten aromatischen Aminosäureresten gebildet wird. Diese Bindungsstelle der Domäne besteht aus drei Taschen, die in (Abb. 2B) dargestellt sind. Zwei der Taschen werden durch ein Dipeptid mit der

Aminosäurenfolge xP besetzt. Die dritte Tasche ist der spezifische Bindungsort der SH3-Domänen. Die Tasche besteht aus negativ geladenen Aminosäuren. Sie wird durch die basischen Aminosäure R (*Arginin*) oder K (*Lysin*) des Liganden besetzt (4). In der Regel werden hier Sequenzabschnitte erkannt, die vermehrt die Aminosäure Prolin aufweisen. In der Region bindet im Allgemeinen der Liganden mit dem konservierten xPxxP-Motiv (*P Prolin, x-beliebige AS*) siehe (Abb. 2A).

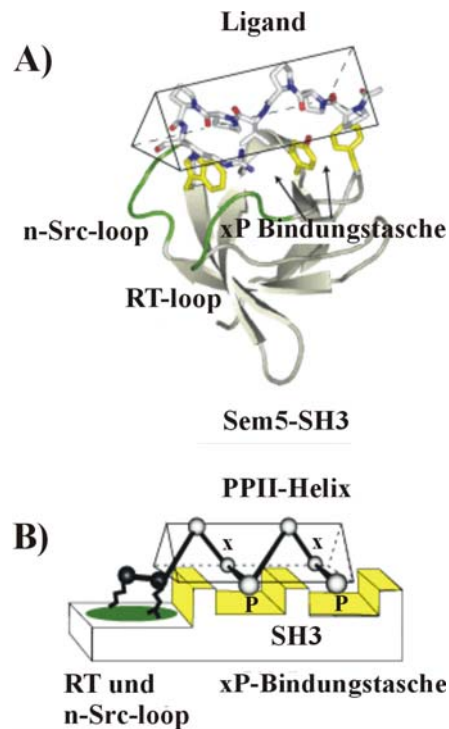


Abb. 2: **A) Struktur und Bindungsmechanismus einer SH3-Domäne:** Dargestellt ist die SH3-Domäne von Sem5, die einen Polyprolinliganden bindet. **B) Darstellung der Bindungsoberfläche von Sem-SH3, in der ein Ligand bindet:** Die Bindungsoberfläche der Domäne besteht aus drei Taschen (grün und gelb gekennzeichnet). Hier wird der prolinhaltige Ligand (in schwarz dargestellt) erkannt. Weiter ist die schematisch-räumlich und trianguläre Struktur des Liganden (PPII-Helix) zu erkennen. **Grün** stellt sich die spezifische Bindungstasche dar, die mit den basischen Aminosäureresten interagiert. **Gelb** stellen sich die zwei konservierten aromatischen Taschen dar, die mit der xP-Sequenz des Liganden interagieren.

Zarrinpar et al, Scienc's stke, Vol.179 2003

Polyprolinhaltige Liganden bilden unter physiologischen Bedingungen eine Polyprolinhelix-2 (*PPII*) aus. Es handelt sich hierbei um eine linksgängige, helicale Struktur mit drei Resten pro Windung. Im Querschnitt ergibt sich ein dreiseitiges Prisma (Abb. 2).

Diese Sekundärstruktur liegt in der Besonderheit des Prolins. Es ist die einzige natürliche Aminosäure, die N-substituiert vorliegt. Damit handelt es sich genau genommen um eine Iminosäure, deren Alpha-Kohlenstoffatom und Stickstoff kovalent im Fünfring gebunden sind. Die resultierende Kombination aus sterischer Behinderung durch Prolin, dem Fehlen von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und der eingeschränkten Bewegungsfreiheit der Peptidbindung sind die Voraussetzungen für die Ausbildung der PPII im wässrigen Milieu (12)(13)(14).

In der PPII zeigen die Prolinringe, die C-Atome (*Kohlenstoffatome*) und die Carbonylsauerstoffatome des Peptidrückgrates regelmäßig von der Helixachse zum Lösungsmittel (14). Der Verlust der Wasserstoffatome in der Amidbindung führt zu einem guten H-Akzeptor für intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Rigidität, die Exposition der Helixstrukturen und die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Prolinringen des Liganden und den Ringen der aromatischen Aminosäurereste der SH3-Domäne ist sehr gut für reversible Proteininteraktionen prädestiniert (4). Die experimentell gefundenen schwachen SH3-Ligand-Wechselwirkungen bestätigen dies. Die Bindungsaffinitäten zu ihren Liganden liegen im Bereich von 1-100 μM (15).

Der flache hydrophobe Prolinring ist komplementär zu den ebenfalls flachen und hydrophoben Ringen der aromatischen Aminosäurereste, die in den Domänen die Bindungstaschen ausbilden.

Bei den SH3-Domänen erfolgt die Ligandenerkennung nicht über den gesamten Prolinring, sondern nur über einen Teil, nämlich dem Delta-Kohlenstoff- und dem Stickstoffatom, während das Alpha-Kohlenstoffatom immer von der Bindungsfläche wegzeigt. Demnach erkennen SH3-Domänen das N-substituierte C-Atom (4).

Für die SH3-Domänen konnten Ligandenpräferenzen festgestellt werden (11) (16) (17) (18). Mit weiterführenden Screeningmethoden (*Phagedisplay*) stellte sich heraus, dass es sich im Allgemeinen um prolinhaltige Liganden handelte, die ein spezifisches Motiv aufwiesen (19).

Ausgehend von dieser Erkenntnis wurden die Liganden in 2 Klassen in Abhängigkeit der Position der basischen Aminosäuren unterschieden: Klasse-1-Liganden mit dem Motiv $\text{N-R/KxxPxxP}_\text{C}$ und Klasse-2-Liganden mit dem

Konsensus $N\text{-}xPxxPxR/K_C$. Weitere Untersuchungen der Konsensusmotive ergab folgende Unterklassen: 1@ $Px@xxPxxP$, 2D $PxxDY$ sowie einige ungewöhnliche Erkennungssequenzen, die bei Cesareni et al (19) beschrieben wurden.

Die Klassifikation der Liganden beruht auf der Pseudosymmetrie (Abb. 3), eine besondere Eigenschaft der PPII-Helix. Bei einer Rotation um 180° in der Vertikalen nehmen die Prolinringe und C-Atome des Rückgrates dieselbe Position ein. Dadurch wird erklärt, weshalb PPII-helixerkennende Domänen prinzipiell den Liganden in zwei Orientierungen binden können (3) (4).

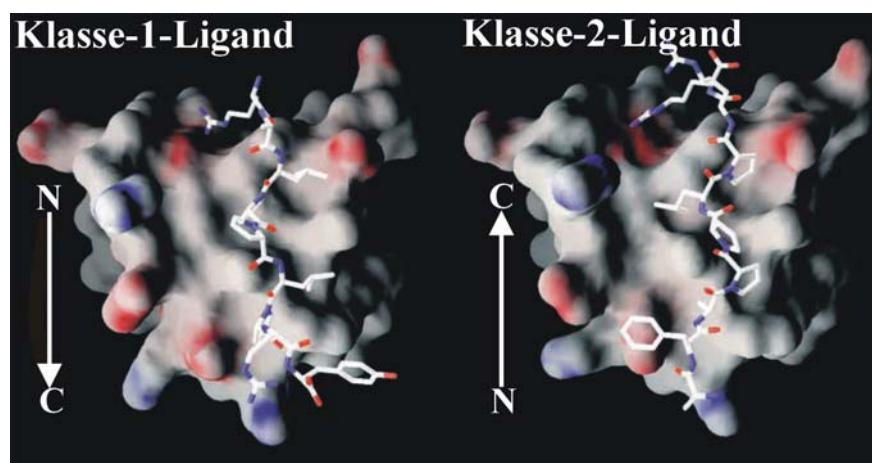


Abb. 3: **Schematische Darstellung der Ligandenbindungsmöglichkeit einer SH3-Domäne:** Gezeigt wird eine SH3-Domäne, die einen Klasse-1-Liganden bzw. einen Klasse-2-Liganden binden kann. In beiden Abbildungen ist ausgehend vom Liganden links der RT-Loop und rechts der n-Src-Loop. Die Orientierung des Klasse-1-Liganden vom N- zum C-Terminus in der Bindungstasche ist auf der linken Seite zu sehen, und die des Klasse-2-Liganden in der gleichen Tasche von C- zum N-Terminus auf der rechten Seite zu sehen ist. Die Liganden unterscheiden sich nur in einer Rotation von 180° in der Vertikalen. Beim Klasse-1-Liganden zeigen die Prolinreste des $PxxP$ -Motivs zum RT-Loop und beim Klasse-2-Liganden zum n-Src-Loop. Die Positionen der zwei unspezifischen Taschen und der spezifischen Tasche bleiben konstant.

B. Mayer, J Cell Sci., Vol. 114 2001

Die Spezifität der Domänen wird nicht nur durch die Sequenz des Liganden (4) (20) (21) bestimmt, sondern auch durch ihre eigene Bindungsregion. Eine Veränderung der einen Seite wirkt sich daher immer auf die andere Seite mit aus. Für die SH3-Domänen bedeutet dies, dass Modifikationen in den Loops Änderungen in der Spezifität der Domäne bedeuten können (22).

Neben den SH3-Domänen gibt es weitere Domänen, die prolinhaltigen Liganden

erkennen. Dazu zählen unter anderem die WW-, EVH1- und GYF-Domänen (3). WW-Domänen sind die kleinsten stabilen natürlichen β -Faltblattstrukturen, welche zwei hochkonservierte Tryptophanreste (*WW*) enthalten. In der hauptsächlich durch Aromaten gebildeten Bindungstasche kann ein prolinreicher Ligand erkannt werden.

Die EVH1- bzw. WH1-Domäne erkennt einen Polyprolinliganden, der in einer hydrophoben Tasche gebunden wird.

Die GYF-Domänen sind benannt nach ihren hoch konservierten Aminosäuren Glycin, Tyrosin und Phenylalanin (*GYF*). Diese Domäne besteht aus einer unspezifischen, aromatischen und einer spezifischen, negativ geladenen Bindungstasche (3).

1.3 Selektivität und Promiskuität; Regulationsmechanismen in der Zelle

Die Zelle stellt eine Basiseinheit des Lebens dar. Es ist daher von großem Interesse, wie das Organisationsprinzip der Zelle in Antwort auf interne und externe Signale funktioniert. An der Signalübermittlung sind Proteine beteiligt, die ein hochkompliziertes und dynamisches Netzwerk ausbilden, das erst im Begriff ist, verstanden zu werden (23) (24) (25) (26).

Die Komplexität des Proteinnetzwerkes ist abhängig von der Möglichkeit, Interaktionen zwischen zellulären Proteinen über ihre Domänen einzugehen und nimmt mit der Entwicklungsstufe des Organismus zu. So steigt z.B. die Zahl der SH3-Interaktionsdomänen von 27 bei *Saccharomyces cerevisiae* auf 409 beim *Homo sapiens* an (27). Die Abbildung (Abb. 4) verdeutlicht die hohe Komplexität des Netzwerkes von nur vier SH3-Domänen.

Im Zusammenhang mit der Proteininteraktion definiert der Begriff Selektivität die Reduktion der Interaktionsmöglichkeiten der Domänen in Bezug auf die Gesamtheit der potentiellen Liganden. Die Spezifität charakterisiert die Interaktion zwischen einer Domäne und dem jeweiligen Liganden. Promiskuität definiert in diesem Kontext die Möglichkeit, dass eine Vielzahl von Interaktionen zwischen Liganden und unterschiedlichen Domänen auftreten können.

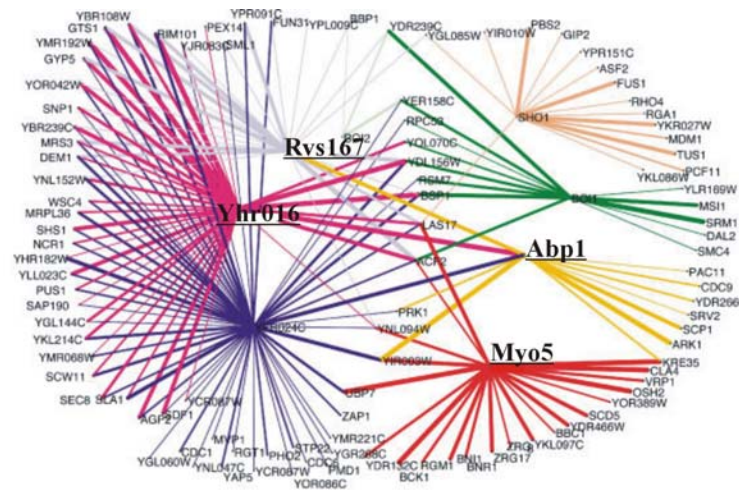


Abb. 4: **Ausschnitt eines SH3-Proteinnetzwerkes in *Saccharomyces cerevisiae*:** Die Farben der Linien entsprechen den einzelnen Interaktionen zwischen den Proteinen, die durch SH3–Domänen vermittelt wurden. Der Durchmesser der Linien ist proportional zu den gemessenen Signalintensitäten der jeweiligen Bindung. Fett unterstrichen sind die vier näher zu charakterisierenden SH3-Domänen von Myo5 (rot), Abp1 (blau), Rvs167 (hellblau) und Yhr016 (pink).

Landgraf et al 2004, Plos Biology Vol.2

Die geringe Zahl von Domänen im Verhältnis zum gesamten Proteom zeigt (ca. 30 SH3-Domänen zu 6000 Hefeproteine), dass z.B. ein limitierter Satz von SH3–Domänen in der Hefezelle ausreicht, um spezifische biologische Antworten zu erhalten (26). Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass während der Evolution Transduktionswege mit dem Ziel einer Optimierung der Zellregulation selektiert wurden.

Ein Modell zum SH3-Domänennetzwerk geht von zwei Faktoren aus, die als Grundlage für die Verstärkung der Selektivität und Spezifität im Rahmen der Proteinwechselwirkung zu verstehen sind: der positiven und negativen Selektion (21).

Durch die positive Selektion wird sichergestellt, dass sich ein Transduktionsweg (Abb. 5b) im Laufe der Evolution erfolgreich durchsetzt (4) (21). Durch die negative Selektion werden Kreuzreaktionen (*Promiskuität*) zwischen anderen Domänen und einem Liganden minimiert (Abb. 5b) (21). Das spezifische Ensemble zwischen Domäne und Ligand konnte sich über die Änderung im Erkennungsprofil fest etablieren (28).

Ein Beispiel für die möglichen starken Auswirkungen negativer Selektion (Abb. 5b) ist die hochspezifische Interaktion zwischen der SH3-Domäne von Sho1

(osmotischer Drucksensor in der Hefe) und der Pbs2-MAPKK im Hog1-MAP-Kinasensignalweg zu nennen. Im Laufe der Evolution führte die hohe Spezifität dieser Interaktion dazu, dass es im Proteom der Hefe keinen alternativen biologisch wirksamen Liganden außer dem S[+]xLPxxP-Motiv im Pbs2-Protein gibt (21).

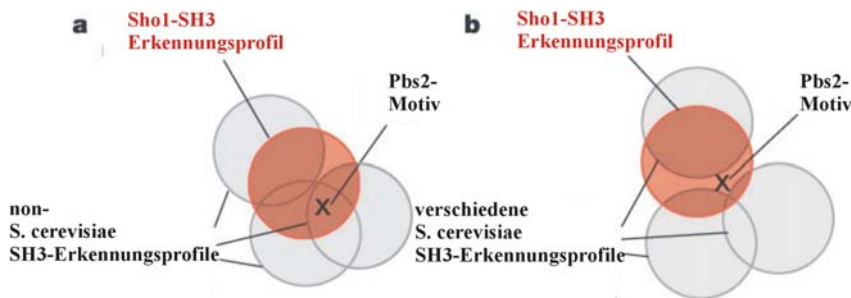


Abb. 5: **Modell: Rolle der negativen Selektion für ein spezifisches Interaktionsnetzwerk:**

a) Das PxxP-Motiv von Pbs2 (gekennzeichnet mit einem X) wird neben Sho1-SH3 von SH3-Domänen anderer Spezies erkannt. Die Interaktion zwischen den SH3-Domänen und dem Pbs2-Motiv ist promiskuitiv, da die Erkennungsprofile (rote und graue Kreise) für diesen Liganden überlappen. **b)** Das Pbs2-Motiv (gekennzeichnet mit einem X) ist in der Hefe einzigartig. Das Motiv liegt nur im Erkennungsprofil (rote und graue Kreise) von Sho1-SH3. Es ist hoch selektiv für Sho1-SH3.

Zarrinpar et al 2003, Nature Vol. 426

Eine weitere Feinabstimmung der Selektivität kann durch physiologische Parameter der Zelle, wie z.B. die Kompartimentierung in der Zelle, Faltung von Proteinen, Konzentrationsveränderungen, unterschiedliche zeitliche Abläufe der Translation und in der Ausbildung von Multiproteinkomplexen erfolgen (4).

Letztendlich ist es die Balance zwischen Selektivität und Promiskuität, die einem Organismus die nötige Widerstandsfähigkeit gegen Umweltveränderungen verleiht (27). So wird ein gewisses Maß an Promiskuität im Erkennungsprofil benötigt, damit alternative Wege bei einem Ausfall einer Komponente z.B. in der Zytoskelettorganisation einschaltet werden können bzw. sich neu entwickeln können.

In der Zelle besteht die Möglichkeit, dass einige Prozesse der Zellorganisation wie z.B. die in der Zytoskelettorganisation der Hefe alternativ aktiviert werden können (29). Diese Eigenschaft der Zelle wird als funktionelle Redundanz bezeichnet (4). Hingegen ist die Regulation des osmotischen Druckes einer engen Kontrolle unterlegen. Jede Fehlregulation der osmotischen Verhältnisse würde zum Tod der Hefe führen. Warum diese biologischen Zellprozesse

unterschiedlich redundant sind, ist noch nicht geklärt.

Wenn die Proteinwechselwirkungen zwischen der SH3-Domäne und ihren Liganden näher betrachtet wird, so fällt auf, dass die Affinitäten zwischen diesen Proteinen in einem Bereich von 1-100 μM gering und sehr variabel sind. Der Gedanke liegt nahe, dass eine niedrige Affinität auch eine geringe Spezifität bedeutet. Das ist nur bedingt richtig, da die Ergebnisse von Zarrinpar et al (21) zeigen, dass die Spezifität nicht nur von der Affinität abhängig ist. Der Vergleich der Erkennungsprofile zwischen Sho1-SH3 und den Profilen der SH3-Domänen von verschiedener Spezies (Abb. 5a) bzw. unterschiedlicher Hefe-SH3-Domänen (Abb. 5b) veranschaulicht, dass weitere spezifische Informationen, die zu einer Protein-Domäneninteraktion führen, in der Sequenz des Pbs2-Liganden zu suchen sind (21). Für das Hefeproteom ist die Sho1-SH3-Pbs2-Interaktion hoch selektiv und spezifisch, trotz der niedrigen Bindungskonstanten von 1,3 μM (*Streptavidin-Biotin-Interaktion* 10^{-14} M).

Diese Vermutung ist der Ansatzpunkt für diese Arbeit. Mit Hilfe der SPOT-Synthese (29) (30) (31) (32) soll eine repräsentative Ligandenbibliothek der Hefe hergestellt werden und danach mit vier ausgesuchten SH3-Domänen aus der Hefe auf Selektivität und Promiskuität untersucht werden. Der Vorteil der SPOT-Synthese im Vergleich zu anderen etablierten Screeningverfahren (*Phage Display* und *Yeast-Two-Hybrid*) ist die Möglichkeit, die erhaltenen Signale semiquantitativ auszuwerten. Über die Stärke der erhaltenen Signale kann eine Korrelation zur Größe der Affinität der bestehenden Ligand-Domäneninteraktion gezogen werden (30).

1.4 Untersuchte SH3-Domänen

Die Hefe enthält 27 SH3-Domänen (27). Aus diesem Satz wurden vier Domänen ausgewählt, die die Liganden der Haupt- und Unterklassen erkennen (19); siehe (Tab. 1).

Tab. 1: Charakterisierung der ausgewählten SH3-Domänen

Protein/ SH3-Domäne	Swissprotcode	Konsensus	Ligandenklasse
Abp1	http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P15891	+xx PxxP x+PxW#	2K
Myo5	http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q04439	Px@xx PxxP	1@
Rvs167	http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P39743	Rx# PxxP x PP#PPR	1R 2R
Yhr016	http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P32793	x PxLP xR	2R

1.5 Medizinische Zusammenhänge

1.5.1 Malaria und Tuberkulose

Die SH3-Domänen sind nicht nur interessant wegen ihrer Verbreitung im Proteinnetzwerk von Zellen, sondern auch aufgrund eines möglichen Ziels von neuartigen Pharmaka gegen Pathogene des Menschen. Ein möglicher Ansatz in der Bekämpfung von Malaria und Tuberkulose könnten die artspezifischen PxxP-Motive sein.

Malaria und Tuberkulose zählen zu den am weitesten verbreiteten Erkrankungen auf der Welt. Die WHO geht von über 400-500 Mio. Malariafällen pro Jahr aus, von denen etwa eine Million letal enden. Der Erreger ist der tierische Einzeller *Plasmodium falciparum*, wobei dieser schon Resistenzen gegen die Chemoprophylaxe aufweist (33).

An Tuberkulose sterben jährlich 2 Mio. Menschen, und es sind weltweit ca. 10 Mio. Personen infiziert (34). Es gibt zwei Spezies von Erregern: *Mycobakterium tuberculosis* und *M. bovis*. Die Behandlung erfolgt über eine langwierige Antibiotikamehrfachtherapie. Die verabreichten Therapeutika sind Isoniazid, Rifampicin, Ryrazinamide, Streptomycin und Ethambutol (35). Bei nicht konsequenter Therapie treten Resistenzen auf, die eine effektive Behandlung erschweren oder sogar unmöglich machen (36). Die vermehrt auftretenden multiresistenten *Mycobakterien* stellen eine große Herausforderung an die Medizin dar.

Angesichts dieser Lage wird nach immer neuen Therapiestrategien gesucht.

Eine mögliche Strategie stellt dabei ein Ligand dar, der Proteininteraktionen in diesen beiden Pathogenen negativ beeinflusst. Dazu wurden die Proteome von *P. falciparum* und des *Mycobakterium* nach möglichen PxxP-Motiven durchmustert. Es wurden Liganden gefunden, die nicht im humanen Proteom vorkommen. Daraus ergab sich eine Reihe von möglichen Medikamentenangriffspunkten, die auf die Energieversorgung oder auf den Internalisationsprozess zielen. Weitere klinische Untersuchungen sind allerdings noch abzuwarten (37).

1.5.2 Amphiphysin I

Amphiphysin1 ist das humane Homolog zum Hefeprotein Rvs167. Das Protein ist im Endozytosemechanismus in terminalen Nervenenden involviert. Dort bindet es an das GTPase Protein (*Guanosintriphosphatase*) Dynamin, das an der Trennung der Vesikel von der Plasmamembran beteiligt ist (38).

Charakteristisch für das paraneoplastische Stiff-man-Syndrom (*PSMS*) sind Autoantikörper gegen Amphiphysin1. Bei diesem Syndrom treten häufig das kleinzellige Bronchialkarzinomen, das Mammakarzinomen, der Morbus Hodgkin, das Thymom und das Kolonkarzinom auf. Im Zusammenhang mit dem seltenen paraneoplastischen Syndrom sind die Pathogenese und die Rolle der Autoantikörper gegen Amphiphysin nicht geklärt. Das Stiff-man-Syndrom ist klinisch charakterisiert durch massive rigide Steigerung des Muskeltonus mit schmerzhaft einschießenden Spasmen. Diese Spasmen können so stark sein, dass Muskelfaserrisse und Knochenbrüche auftreten. Pathophysiologisch nimmt man eine Schädigung spinaler Interneurone an. Dadurch kommt es zur Dauerinnervation der Alphamotoneurone (39)(40).

1.5.3 AmphiphysinII/ BIN1

Das Protein ist ebenfalls ein humanes Homolog zum Hefeprotein RVS167. BIN1 bindet als Adapterprotein an das c-Myc-Protein. c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der im Zellproliferations- und Apoptosemechanismus eine wichtige Rolle spielt(41).

Die Proteininteraktion ist in der p53-unabhängigen und p53-abhängigen Apoptose von Bedeutung (42). Dieser Mechanismus spielt besonders in der Tumorsuppression und dem Zelltod von entarteten Mesenchym- und Epithelzellen eine Rolle (41).

Eine Suppression oder Inaktivierung von BIN1 unterstützt die maligne Entartung von Epithelzellen z.B. zum primären Brustkrebs. Hier fällt die Regulation von c-Myc weg, und es kommt zu einer Entartung in diesem Gewebe (43).

2 **Thema**

Mit Hilfe der Peptid-Array-Technologie soll die Selektivität von vier ausgewählten Hefe-SH3-Domänen untersucht werden. Hierzu sollen:

1. Mehrere identische zellulosegebundene Peptidarrays mit Hilfe der

SPOT-Synthese hergestellt werden.

2. Die synthetisierten Arrays sollen auf Bindung zu den SH3-Domänen von Myo5, Abp1, Yhr016 und Rvs167 getestet werden.

3. Ausgesuchte Liganden sollen anschließend mittels Substitutions- und Längenanalyse charakterisiert werden.

4. Die Bindungsaffinitäten sollen über Oberflächenplasmonspektroskopie quantifiziert werden.

Am Ende soll versucht werden, ob eine Aussage hinsichtlich Selektivität/Promiskuität der gewählten SH3-Domänen getroffen werden kann.

3 Materialien/ Methoden

3.1 Die SPOT-Technologie: chemischer Teil

Die SPOT-Synthese ist eine einfache Methode zur parallelen Herstellung von Peptiden auf einem planaren Träger (*Festphasensynthese*). Die Methode ist in mehreren Übersichtsartikeln beschrieben (29) (30) (44).

Vorteil der SPOT-Synthese ist der mögliche Einsatz von natürlichen-, nichtnatürlichen-, modifizierten Aminosäuren, Dipeptiden sowie organischen Verbindungen als Bausteine in der Synthese. Je nach Aufgabenstellung können unterschiedliche planare Trägermaterialien genutzt werden. Es werden porösplane Membranen: Zellulose-membranen oder Polypropylenfleece und als nichtporösplane Membran: Glas unterschieden (32) (*Volkmer persönliche Mitteilung*).

In der SPOT-Technologie wird ausschließlich die Fmoc-Strategie verwendet. Die Aminosäuren sind N-terminal durch eine Fmoc-Gruppe (*9-Fluorenylmethyloxycarbonyl*) geschützt. Im Verfahren ist es angebracht, den C-Terminus durch einen OPfp-Ester (*ortho-Pentafluorphenyl*) oder ODhbt-Ester (*3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotranzine*) zu aktivieren. Die Synthese der Peptide erfolgt vom C- zum N-Terminus. Die Herstellung der Peptidbibliotheken kann durch Halbautomaten (*Auto-SPOT-Robot ASP 222 XL*) unterstützt werden. Mit Hilfe des Sequenzgenerierungsprogramms (*Lisa 1.57*) werden die Aminosäuresequenzen der herzustellenden Peptide zusammengestellt, der Syntheseort festgelegt und die Steuerprogramme für die Herstellung der Peptidbibliothek erzeugt. Die Methode eignet sich sehr gut, um große Mengen an Peptiden parallel und ortsadressiert auf planaren Trägern zu synthetisieren. Bis zu 8000

unterschiedliche Spots können auf einer chemisch modifizierten Zellulosemembran (*Whatmann 50 Filterpapier, Maidstone, United Kingdom*) der Größe 19x29 cm erzeugt werden.

Der Ablauf einer SPOT-Synthese verläuft über die folgenden Schritte (Abb. 6).

- a) : Durch tropfenförmiges Aufbringen einer Lösung von Fmoc- β -Ala-Opfp-Ester in DMSO (*Dimethylsulfoxid*) werden die Synthesorte auf der amino-modifizierten Zellulosemembran definiert. Hierbei wird β -Alanin kovalent über eine Amidbindung an den Träger gebunden.
- b) : Um die Reaktionsflächen zwischen den benachbarten Spots zu blockieren, wird die Membran nach dem Auftragen von Fmoc- β -Alanin-Opfp-Estern (*Verbindungs-moleküle zwischen der CAPE-Membran und dem Peptid*) mit einer Lösung aus Acetanhydrid und Diisopropylamin gelöst in Dimethylacetamid acetyliert.
- c) : Danach folgt der schrittweise Aufbau der vorgegebenen Aminosäuresequenz im Wechsel mit der nukleophilen Abspaltung aller Fmoc-Gruppen mit Piperidinlösung, den Waschschritten mit DMA, Ethanol und Ether sowie dem reversiblen Anfärben mit Bromphenolblau. Diese Arbeitsschritte wiederholen sich, bis die gewünschte Länge des Peptides erreicht ist (Abb. 7).
- d) : Am Ende der Peptidsynthese werden die Seitenschutzgruppen mit Trifluoressigsäure (*TFA*) sauer abgespalten.
- e) : Nach der Abspaltung der Seitenschutzgruppen kann die Peptidbibliothek durchmustert (*gescreent*) werden. Dazu werden proteingekoppelte (z.B. *Glutathion-S-Transferase-markiert*) Zielmoleküle (*SH3-Domänen*) verwandt. Die Bindung zwischen Peptid und Domäne wird über ein peroxidase-gekoppeltes Antikörpersystem erkannt. Ein Farbstoff wird durch die Peroxidase oxidiert. Dabei wird Licht emittiert, das über einen Detektor visualisiert werden kann.

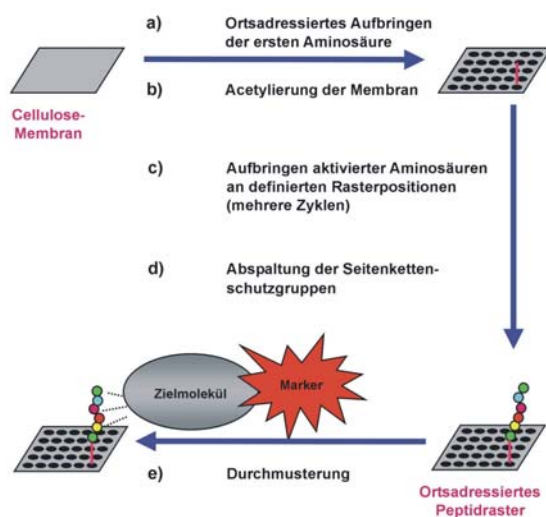


Abb. 6: Grundprinzip SPOT-Verfahren zur Peptidsynthese auf Cellulosemembranen:

3.1.1 Praktische Durchführung der SPOT-Synthese

Herstellung einer CAPE-Membran:

Das Ausgangsmaterial ist ein 19x29cm großes Filterpapier (*Whatmann 50, Maidstone, United Kingdom*). Im ersten Arbeitsschritt wird die Zellulose-Membran mit 400 mg para-Toluolsulfonsäure (*PTS, Firma Fluka*), gelöst in 50 ml Methanol (*MeOH, Firma Merck*) angesäuert. Dazu wird die Membran in die Lösung gegeben, und 5 min geschüttelt (*Rocky®, Firma Fröbel Labortechnik*). Nach dem Abgießen der Lösung wird die Membran bei 30°C getrocknet.

Die Ansätze A und B (Tab. 2) werden auf 80°C erhitzt, und in eine vorgeheizte Instrumentenschale gegeben. Danach wird die Membran eingelegt und 3h bei 80°C geschüttelt.

Tab. 2: Ansatz zur Derivatisation der Zellulose

Chemikalie	Hersteller	Menge
A) 1,4-Dioxan	Merck	45ml
N-(2,3-epoxypropyl)-phthalimid	Merck	8g
B) 1,4-Dioxan	Merck	5ml
para-Toluolsulfonsäure (PTS)	Fluka	400mg

Lösungen einzeln in Bechergläsern bei 80°C gelöst

Anschließend wird die Membran 3x5 min mit Dioxan und 2x5 min mit Ethanol (*EtOH*) bei RT gewaschen. Danach wird die primäre Aminofunktion durch das Abspalten der Phthalimidgruppe mittels Hydrazinhydrat erzeugt (Tab. 3).

Tab. 3: Ansatz zur Bildung der primären Amidgruppe

Chemikalie	Hersteller	Volumen
Ethanol	Herbeta Arzneimittel	60ml
Hydrazinhydrat (80%ig)	Merck	6ml

Lösung auf die Membran geben, 6-8 Std. inkubieren bei Raumtemperatur.

Nach den sich anschließenden Waschschritten (*2x EtOH waschen, 3x DMA [Firma Merck] waschen, 2x EtOH waschen, 2xEther [Firma Merck] waschen und trocknen*), ist die Zelluloseaminopropylether-Membran (*CAPE-Membran*) für die eigentliche SPOT-Synthese fertiggestellt.

Fmoc-Quantifizierung:

Die Beladung der Membran mit primären Aminofunktionen wird über die Fmoc-Quantifizierung bestimmt. Dazu werden am Rand der Membran fünf Spots mit je 1 µl 0,3 M Fmoc-β-Alanin-OPfp in Dimethylsulfoxid (*DMSO, Firma Merck*) gelöst aufgetragen. Die Reaktionszeit beträgt 15 min. Die Kopplung wird zwei Mal wiederholt. Anschließend kann das Membranstück abgeschnitten, mehrfach gewaschen und getrocknet werden. Die Spots können jetzt ausgestanzt, in je ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und mit je 1ml 20% Piperidin versetzt werden. Nach dem Verschließen der Reaktionsgefäße wird 20 min geschüttelt. Anschließend wird für jeden Spot die Absorption bei 302 nm in einem UV-Spektrometer (*Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech, England*) bestimmt. Als Blindwert dient eine 20% Piperidinlösung. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt nach dem Lambert-Beer-Gesetz.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

E-Extinktion, ε -Extinktionskoeffizient, c-Konzentration, d-Durchmesser

$$\varepsilon = 8100 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Die für diese Arbeit verwendeten Membranen hatten nach den Messungen eine Beladung zwischen 16 und 20 nmol/cm².

Definieren der Spots für die Synthese:

Eine 0,3 M β-Alanin-OPfp-Lösung in Dimethylsulfoxid (*DMSO, Firma Merck*) wird hergestellt und mit Hilfe des Auto-Spot Robot ASP 222 XL punktförmig auf die CAPE-Grundmembran aufgetragen. Anschließend werden alle nicht benetzten Aminogruppen nach folgendem Prozedere acetyliert: Die Membran wird 2-3 min in eine Lösung aus 2% Acetanhydrid in DMA gelegt. Danach wird der Träger 30 min in einem Gemisch aus in DMA gelösten 2 % Acetanhydrid

(Firma Merck), 1% N-Ethyl-Diisopropylamin (DIPA, Firma Merck) in DMA geschüttelt. Nach der Acetylierung werden folgende Schritte ausgeführt: 5x Waschen mit DMA, 20 min Fmoc-Gruppenabspaltung mit 20% Piperidin (Firma Merck) in DMA, 5x Waschen mit DMA á 3 min und anschließend 2x Waschen mit EtOH á 3 min. Die freien Aminogruppen werden reversibel mit Bromphenolblau (Firma Fluka) angefärbt. Danach folgen 2 Waschschritte mit EtOH á 2x3 min und Ether (Firma Merck) á 2x3 min.

Herstellung der Aminosäurelösungen:

Fmoc- β -Alanin-OPfp wird für die erste Kopplung und die Fmoc-Quantifizierung in Dimethylsulfoxid (DMSO, Firma Merck) gelöst.

Die anderen Aminosäuren (Tab. 14) werden in 1-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP, Firma Merck) gelöst. Alle Aminosäuren werden von Bachem oder Nova Biochem erworben. Die Konzentration beträgt durchgehend 0,3 Molar.

Synthese der zellulosegebundenen Peptide:

Die Aminosäuren werden nacheinander nach dem gleichen Arbeitsablauf (Abb. 7) auf die Membran aufgetragen: 3x3 min waschen mit DMA, 20 min Fmoc-Gruppenabspaltung mit 20% Piperidin in DMA, 5x3 min waschen mit DMA, 2x3 min waschen mit EtOH, Anfärben der freien Aminogruppen mit Bromphenol-blau (Firma Fluka), 2x3 min waschen mit EtOH und zuletzt 2x3 min waschen mit Ether. Durch die Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird der N-Terminus der Aminosäure für den sich anschließenden Reaktionszyklus freigesetzt. Die Reaktionszeit für die Bildung der Amidbindung beträgt pro Kopplungszyklus 15 min. Um die kontrollierte Verlängerung der Peptidketten zu ermöglichen, sind die funktionellen Seitenketten der Aminosäuren geschützt (siehe Tab.4). Am Ende der Peptidsynthese müssen diese Gruppen in zwei Arbeitsschritten abgespaltet werden.

Tab. 4: Schutzgruppen der Aminosäuren

Schutzgruppe	Aminosäure
Trityl	für Cystein, Asparagin, Glutamin
t-Butyloxycarbonyl	für Histidin, Lysin und Tryptophan
Pentamethylchroman-6-sulfonyl	für Arginin
t-Butyl	für Glutamat, Aspartat, Serin und Threonin

Im ersten Abspaltungsschritt werden die zellulosegebundenen Peptide dieser CAPE-Membran mit einer 90% Trifluoressigsäurelösung (TFA) (siehe Tab. 5) für 30 min ohne Schüttelbewegungen inkubiert.

Tab. 5: Abspaltung 1

Chemikalien	Hersteller	Menge
destilliertes Wasser		1ml
Dichlormethan (DCM)	Merck	2,5ml
Phenol	Merck	0,5g
TFA	Merck	45ml
Triisobutylsilan (TIPS)	Merck	1,5ml

Danach erfolgen mehrere Waschschrte:

4x3 min mit DCM, 3x3 min mit DMA, 3x3 min mit EtOH und 2x3 min mit Ether. Im zweiten Abspaltungsschritt wird die Membran mit einer 50% TFA-Lösung (Tab. 6) für 150 min unter Schüttelbewegungen behandelt.

Tab. 6: Abspaltung 2

Chemikalien	Hersteller	Menge
destilliertes Wasser		1ml
Dichlormethan (DCM)	Merck	22,5ml
Phenol	Merck	0,5g
TFA	Merck	25ml
Triisobutylsilan (TIPS)	Merck	1,5ml

Nach den Waschschrten 4x3 min mit DCM, 3x3 min mit DMA, 3x3 min mit EtOH und 2x3 min mit Ether, wird die Membran getrocknet und dann in den Screening-Experimenten eingesetzt.

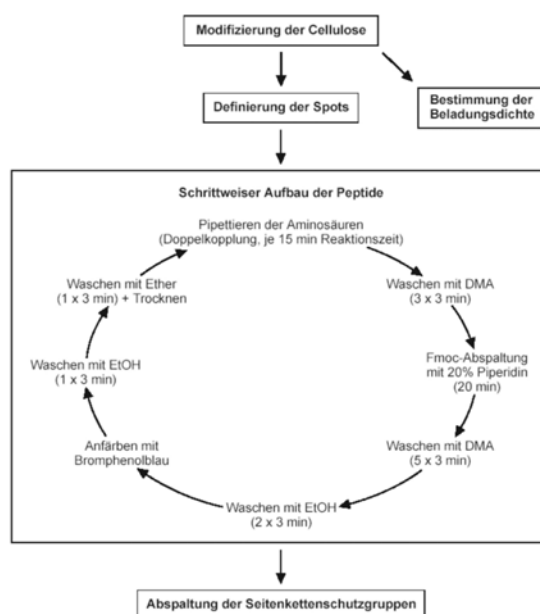


Abb. 7: Zusammenfassung des praktischen Ablaufes der Spotsynthese

3.1.2 Eingesetzte WISE-Arrays

Die Arrays bestehen aus 15 Markierungspeptiden á 10 Aminosäuren mit der Primärsequenz LASDLIVPRR und 2953 Peptiden á 15 Aminosäuren aus dem Proteom der Bäckerhefe. Das Peptid LASDLIVPRR dient als Positionierungshilfe zum Anlegen der Messschablone von dem Programm Genespotter. Die Markierungspeptide erscheinen immer positiv im Screening. Die 2953 Peptide wurden mittels bioinformatischer Werkzeuge erzeugt (Abb. 8) (16).

Die Auswahl der Peptide ist das Ergebnis von Voruntersuchungen der Forschergruppe von Prof. Cesareni (*Universität von Rom*) (16). Die 2953 polyprolinhaltigen Sequenzen wurden durch einen limitierenden Suchalgorithmus aus dem Hefeproteom (5885 Proteine) gewonnen. Diese Anzahl der Peptide ist für die SPOT-Synthese handhabbar.

Die Untersuchung soll zum ersten Mal Aufschluss über die Selektivität der SH3-Domäne mit einer möglichst repräsentativen Anzahl von polyprolinhaltigen Liganden der Hefe geben. Vier CAPE-Membranen werden nach dem Standardprotokoll (29) (30) (31) mit 2968 Peptiden hergestellt, mit den SH3-Domänen und Antikörpern nach dem Standardprotokoll inkubiert und im Lumi-Imager ausgewertet (3.2.1).

WISE-Strategie

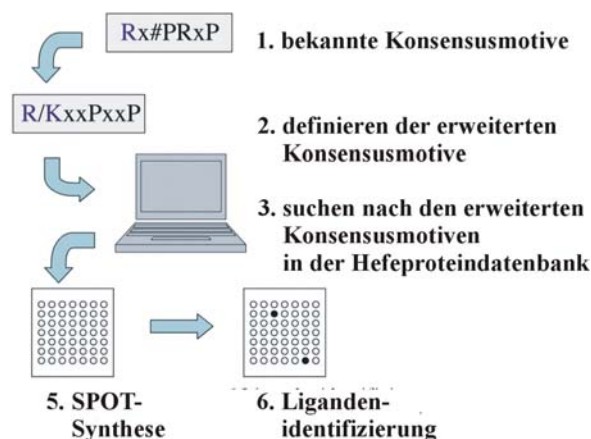


Abb. 8: Schematische Darstellung WISE-Technik:

Landgraf et al 2004, Plos Biology Vol..2

3.2 Die SPOT-Technologie: Screening-Teil

Die via SPOT-Technologie synthetisierten Peptidarrays werden auf Bindungen mit löslichen SH3-Domänen getestet. Das Screenen von Peptidbibliotheken (*als qualitative Untersuchungsmethode*) gehört neben der Protein-Protein-Erkennung, Enzymsubstraterkennung, Metallionenbindung und die Epitopkartierung zu den klassischen Untersuchungsfeldern der SPOT-Synthese (30) (31).

3.2.1 Praktische Durchführung des Screening-Teils der SH3-Peptid-Bindungsstudie

Für die Inkubation der Membran wird eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml Domäne in BB (*Blocking Buffer, Firma Sigma*) genutzt. Die Ausgangskonzentrationen der Domänen sind in (Tab. 16) gezeigt. Alle für diese Arbeit verwendeten SH3-Domänen liegen als GST- (*Glutathion-S-Transferase*) Fusionsprotein vor.

Der Inkubationsschritt der Bindungsstudie für die SH3-Domänen gliederte sich wie folgt:

Die Membran wird 1x 10 min in Methanol gewaschen und hinterher 3x10 min mit TBS (*Tris Buffered Saline*) (siehe 3.7) gewaschen.

Anschließend wird sie 3h bei Raumtemperatur in der Blockierungspufferlösung (Tab. 7) geschüttelt.

Tab. 7: Zusammensetzung des Blocking Buffer (BB)

Chemikalie	Hersteller	Menge
Bl. Buffer (10 fach)	Sigma	5ml
TBS (10 fach)		5ml
Saccharose	Merck	2.5g

mit Aqua dest. auf 50ml auffüllen

Danach wird die Membran 1x 10 min mit TBS waschen. Die SH3-Domänenkonzentration soll in 40 ml Blocking Buffer 10 µg/ml betragen. Diese Lösung wird auf die Membran geben und über Nacht (*12h*) im Kühlschrank (*4°C*) schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wird die Membran 3x10 min mit TBS gewaschen. Anschließend wird die Membran 3h mit dem monoklonalen anti-GST-Antikörper aus der Maus (Tab. 8) inkubiert.

Tab. 8: 1. Antikörperkonzentration in BB

Chemikalie	Hersteller	Konzentration
Anti-GST-Antikörper monoklonales Immunglobulin G (<i>IgG-G-1160</i>) aus der Maus	Sigma	1µg/ ml in BB

Nach den Waschschritten (*3x10 min mit TBS*) wird 1,5h mit dem Anti-Mouse-

IgG-Peroxidasekonjugat inkubiert werden (Tab. 9).

Tab. 9: 2. Antikörperendkonzentration in BB

Chemikalie	Hersteller	Konzentration
Anti-Mouse-IgG Peroxidasekonjugat (A-5906)	Sigma	1 µg/ ml in BB

Es schließt sich ein erneuter Waschschrift für 3x10 min mit T-TBS an.

Die Detektion der Bindung erfolgt über die Chemilumineszenz. Hierzu wird ein Baukastensystem (*Luminol/ enhancer solution*) (Tab. 10) verwendet. Bei der Reaktion wird Luminol durch die Peroxidase zu 3-Aminophthalat oxidiert, wobei Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm emittiert wird. Die Chemilumineszenz ist auf die auf Enzym-Substratreaktion limitiert.

Tab. 10: Bestandteile der Luminol/ enhancer solution

Chemikalie	Hersteller	Bezeichnung
1.Uptilight HRP Blot Reagent A	Interchim, France	UP99619A-A
2.Uptilight HRP Blot Reagent B	Interchim, France	UP99619A-B

Lösung A und B wurden im Verhältnis von 1ml:1 Tropfen zusammengegeben.

Die Membran wird für ca. 1 min. in die Lösung (Tab. 10) gestellt. Die Chemilumineszenz wird anschließend im Lumi-Imager™ (*Boehringer, Mannheim*) gemessen. Die Signalintensität wird in der Einheit „Mean“ mit dem Programm Genespotter (*Microdiscovery, Berlin*) gemessen.

Substitutions- und Längenanalyse von ausgewählten Peptidliganden

Die Erkennungsmotive (*Konsensusmotive*) der vier ausgewählten SH3-Domänen können durch die Substitutions- und Längenanalyse charakterisiert werden.

In der Substitutionsanalyse wird jede Aminosäureposition innerhalb des Liganden systematisch durch alle natürlichen L-Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein ausgetauscht. Es resultiert eine Peptidbibliothek, die alle möglichen Einzelsubstitutionsvarianten des Wildtyp-Liganden enthält. Mit dieser Bibliothek lassen sich die Reste im Liganden identifizieren, die Schlüsselreste für die spezifische Erkennung der SH3-Domänen sind.

Die Längenanalyse erzeugt Variationen des Wildtyp-Liganden, die aus schrittweise N- und C-terminal gekürzten Peptiden besteht. Aus dieser Peptidbibliothek kann der Ligand mit der geringsten Länge ermittelt werden.

Die zwei genannten Peptidbibliotheken werden über das Sequenzregenerierungsprogramms LISA erstellt. Die Arbeitsabläufe werden wie unter 3.1–3.2.1 beschrieben durchgeführt.

3.2.2 Regenerierung der CAPE-Membran

Zur Untersuchung der Regenerierbarkeit der CAPE-Membran wird ein Na-Zitrat/ Zitratpuffer (Tab. 11) verwendet.

Tab. 11: Zusammensetzung des Zitratpuffers

Chemikalie	Hersteller	Menge
Natriumzitrat	Merck	1,73g
Zitronensäure	Merck	0,413g
NaOH	Merck	1M

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt.

Die CAPE-Membran, die mit der SH3-Domäne Abp1 inkubiert wurde, wird für diesen Versuch ausgewählt. Zuerst muss die Membran mit den Antikörpern versetzt und danach ausgewertet werden. Dieses Procedere wird als Kontrolle zu der schon ausgewerteten CAPE-Membran von Abp1-SH3 durchgeführt, da die Membran zur Lagerung eingefroren war und sich eventuell dabei verändert haben könnte.

Die Membran wird 3x20 min in den siedenden Puffer gelegt und zwischendurch für 3 min in siedendem destillierten Wasser gewaschen. Nach 3 Durchläufen wird die Membran im destillierten Wasser über Nacht gewaschen. Anschließend erfolgt eine erneute Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern und anschließender Auswertung (3.2.1).

3.3 Standart-Festphasenpeptidsynthese

Die Sequenzen **ERPKRRAPPPVPKKP** und **VQQDSLPLPFRSWG** werden synthetisiert und für die Untersuchung der Affinitäten zwischen den Liganden und entsprechenden Domänen verwendet.

Die Synthese von löslichen Peptiden wird mit Hilfe eines multiplen Peptidsynthesizers (*MPS, AMS 422 Abimed Langenfeld*) durchgeführt. Das Peptid ist über einen Anker an einem Polystyrolharz (*Tenta Gel S Ram, Firma RAPD Polymere Deutschland mit der Ansatzgröße 50 µmol*) fixiert und kann erst nach Syntheseende vom Harz abgespalten werden. Als Lösungsmittel dient N, N-Dimethylformamid (*DMF, Firma Merck*). Bei jedem Syntheseschritt wird eine Doppelkopplung durchgeführt.

Ein Synthesesyklus des Automaten besteht aus der Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit 20%igem Piperidin und einer anschließenden sechsmaligen Waschprozedur mit DMF, bevor die nächste Fmoc-Aminosäure gekoppelt wird. Vor der nächsten Fmoc-Abspaltung muss sechsmal mit DMF gewaschen werden.

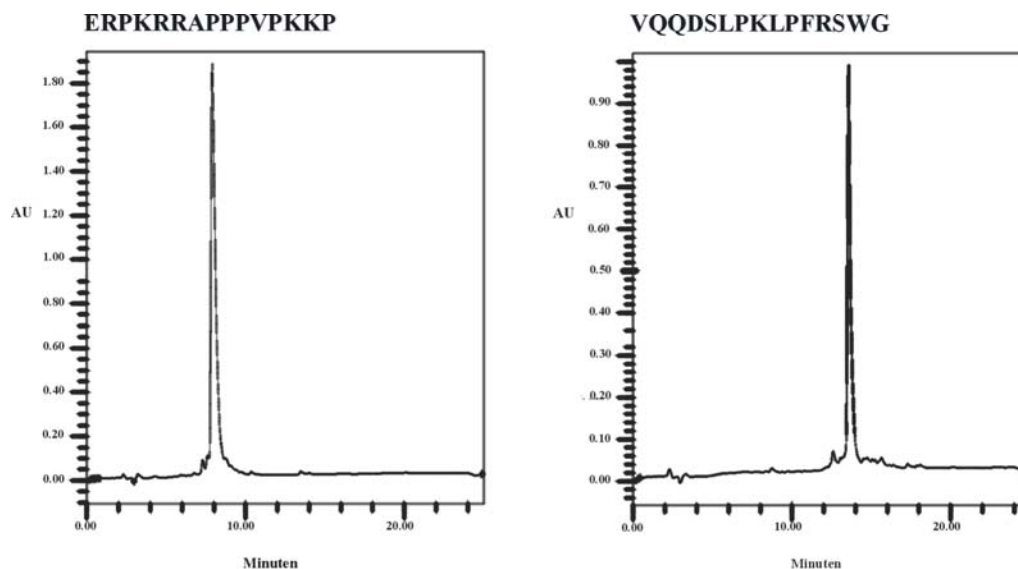
Die Aminosäuren werden im Automaten aktiviert. Für eine Kopplung wird 200 μmol einer Aminosäure in DMF durch Zugabe von 200 μmol (*Benzotriazol-1-yl*oxy)tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (*PyBOP*, *Firma Merck*) in 220 μl DMF und 400 μmol N-Methylmorpholin (*NMM*, *Firma Merck*) in 100 μl DMF zum Aktivieren benötigt.

Die Abspaltung der Peptide vom Harz und die Abspaltung der Seitenschutzgruppen erfolgen durch eine vierstündige Inkubation mit der Abspaltlösung. (2,25 g *Phenol*, 1500 μl *Bidest*, 30 ml *TFA* [*Trifluoressigsäure*]), 750 μl EDT (*1,2-Ethandithiol*), 1500 μl *Methylphenylsulfid*, (*Firma Merck*). Im Anschluss werden die Peptide in tiefgekühlten tert.-Butylmethylether ausgefällt, abzentrifugiert (3200 rpm, 2 min) und das Pellet dreimal mit Diethylether gewaschen und erneut abzentrifugiert (2x 3200 rpm, 2 min; 1x 5800 rpm, 6 min). Alle Peptide werden mittels Reverse-Phase-High-Performance-Liquid-Chromatographie (*rHPLC*) und Laserdesorptions-Flugzeitmassenspektrometrie (*MALDI-TOF*) auf ihren Reinheitsgrad untersucht. Wenn nötig, werden die Peptide mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wird ein linearer Gradient von 20% bis 60% Acetonitril (*Firma Merck*)/ 0,05% TFA gegen Wasser/ 0,05% TFA in 30 min verwendet.

Sehr hydrophobe Peptide werden in 20% Acetonitril und 7% DMSO gelöst und dann bei einem Gradienten von 20% bis 70% Acetonitril/ 0,05% TFA gegen Wasser/ 0,05% TFA in 40 min aufgereinigt.

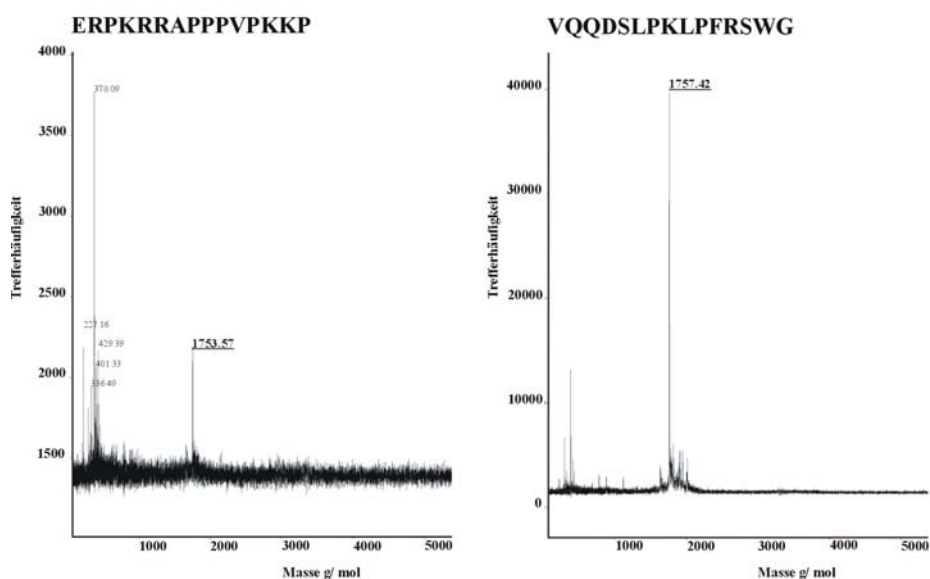
Die gereinigten Peptide werden mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert und zu letzt werden diese Peptide lyophilisiert (*Lyovac GT 2/GT 2*).

Die analytische HPLC zeigt eine Reinheit von 100% in der (Abb. 9). Die mittels MALDI-TOF-Massenspektrometer bestimmten Molmassen stimmen innerhalb des Fehlerbereiches mit den tatsächlichen Molmassen überein (Abb. 10). Der Peak kennzeichnet die gesuchte molare Masse für ERPKRRAPPPVPPKKP bei 1753,57 g/mol (*soll 1753,08 g/mol*) und für VQQDSLPLKLPFRSWG bei 1757,42 g/mol (*soll 1757,97 g/mol*) (Abb. 10).



Analytische HPLC

Abb. 9: Chromatogramme der Liganden ERPKRRAPPPVPPKP (SH3-Abp1 und -Myo5) und VQQDSLPLKLPFRSWG (SH3-Rvs167 und -Yhr016) in der analytischen HPLC:



MALDI-TOF

Abb. 10: Massenspektren (MALDI-TOF) der Liganden ERPKRRAPPPVPPKP (SH3-Abp1 und -Myo5) und VQQDSLPLKLPFRSWG (SH3-Rvs167 und -Yhr016): Das Molekulargewicht der einzelnen Liganden ist in der Abbildung als unterstrichener Wert dargestellt. ERPKRRAPPPVPPKP bei 1753,57 g/mol (soll 1753,08 g/mol) und VQQDSLPLKLPFRSWG bei 1757,42 g/mol (soll 1757,97 g/mol)

3.4 BIAcore/ Surface Plasmon Resonance

Die Bezeichnung BIA steht für die Abkürzung biomolekulares Interaktionsassay. Mit dem BIAcore®-X-Gerät können Informationen über Bindungen

zwischen zwei Partnern, Kinetik und Affinität/ Dissoziationskonstante einer Bindung sowie Konzentrationen an biologisch aktiven Molekülen gewonnen werden.

Die Dissoziationskonstante definiert die Konzentration im Halbsättigungsbereich.

3.4.1 Theoretische Betrachtung

Das Messsystem besteht aus dem Sensorchip bestehend aus dem Glasträger, einer bis zu 56 nm dünnen Goldschicht und der dünnen Matrixschicht, dem Detektor, einer Lichtquelle, die polarisiertes Licht aussendet und einem Flußsystem. Die Flusszelle wird in eine Referenz- und in eine Sensorzelle unterteilt (Abb. 11).

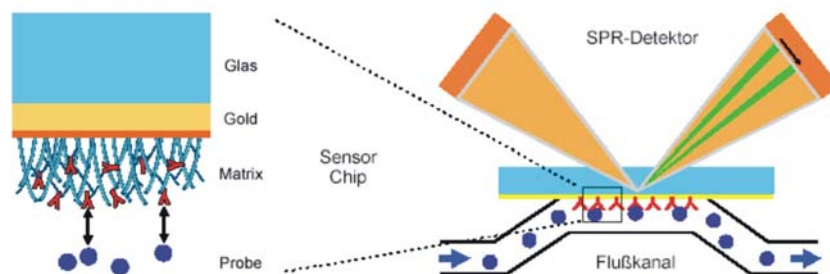


Abb. 11: **Aufbau des CM5-Chips und Aufbau des Meßsystems:**
Linke Graphik: Aufbau des Sensorchips, Dextranmatrix (blau-orange), Goldschicht (gold), Glas (hellblau) **Rechte Graphik:** Aufbau des Meßsystems Flusskanal (schwarzumrandet), Sensorchip (hellblau-gelb), SPR-Detektor (orange) bestehend aus Lichtquelle und dem Sensor. Der Detektor befindet sich auf der Glasseite.

<http://www.biacore.com/technology/how.lasso>

Das Prinzip des Gerätes beruht auf der Totalreflektion an 2 Flächen mit unterschiedlichen Brechungsindices. Durch den einfallenden Strahl wird im Metall eine Oberflächenplasmonresonanz bei einem bestimmten Einfallswinkel (*Resonanzwinkel*) generiert, wenn der Wellenvektor von Licht und Plasmon übereinstimmt. Dieses Phänomen ist von der Beladung der organischen Matrix abhängig. Als Resultat tritt auf der Seite des reflektierten Strahles ein scharfer Schatten auf. Dieses Signal wird durch einen CCD-Chip (*engl. Abkürzung Charge Coupled Device: Ladungsgekoppeltes, analoges Bauelement*) aufgenommen und als SPR-Image auf einem Computer dargestellt. Der Resonanzwinkel hängt dabei direkt vom Brechungsindex bzw. der Dielektrizitätskonstanten der Sensoroberfläche ab. So wirken sich Adsorption

und Desorption von Molekülen durch eine lokale Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche des Sensors aus. Die Änderung im Brechungsindex bringt eine Änderung des Resonanzwinkels mit sich.

Die Resonanzeinheit (RU) definiert eine Änderung von $0,0001^\circ$ im Resonanzwinkel, bei der ein Intensitätsminimum auftritt. Äquivalent steht dieser Winkel für eine Massenänderung von weniger als 1pg pro mm^2 , wenn eine Probe an der beschichteten Chipoberfläche bindet. Der Winkel kann variiert werden, bis sich die Intensitätsminima von Mess- und Referenzzelle gleichen und wird als Resonanzunitdifferenz im Sensorgramm bezeichnet. Letztendlich wird mit dem BIAcore-X-Gerät der Einfallswinkel gemessen, bei dem ein Minimum der Lichtintensität, hervorgerufen durch die Oberflächenplasmonresonanz, auftritt (45) (46) (47).

Es gibt unterschiedliche Sensorchips: **CM-Dextran** (Abb. 12) für die kovalente Kopplung von Proteinen (über Amin-, Thiol-, Aldehyd-, Carboxylreste).

Streptavidin für die Immobilisierung biotinylierter DNA, RNA, Peptide, Kohlehydrate, **Nickel-NTA** für die reversible Adsorption von His-Tag-Proteinen und **Lipid-Capture** für die reversible Adsorption von Lipid-Doppelschichten.

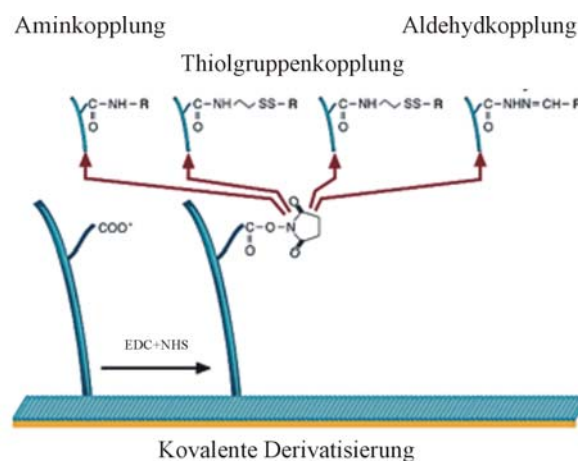


Abb. 12: Schematische Darstellung der Modifizierungsmöglichkeiten der carboxymylierten Dextranmatrix:

<http://www.biacore.com/technology/how.lasso>

3.4.2 BIAcore: praktische Durchführung

Die Messungen erfolgen mit einem BIAcore®-X-System, bei einer Temperatur von 25°C und einer Flussrate von $5\text{ }\mu\text{l/min}$.

Um die Affinitäten der Proteininteraktion messen zu können, muss zunächst der

Sensorchip aktiviert und beladen werden. Der CM5-Chips wird mit dem Amin-kopplungsreagenz (*Firma BIAcore*) 0.4 M 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid (EDC) und 0.1 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) (*Verhältnis 1:1 100 μ l, Fluss 5 μ l/min für 7 min*) aktiviert. Danach erfolgt die kovalente Bindung des Anti-GST-Antikörper (*von der Ziege, Firma BIAcore*) mit einer Konzentration von 0,8 mg/ml und mehrfachen Injektionen von 5-75 μ l. Die Deaktivierung der übrig gebliebenen Aminofunktionen auf der Goldoberfläche erfolgt mit 1 M Ethanolamin-HCL pH 8,5. Die Beladung des CM5-Chips mit dem Anti-GST-Antikörper der Ziege erfolgt nach Herstellerangaben. Das Signal beträgt 6000 RU (*Resonanz Units*), das einer Konzentration von 6 μ g/mm² auf dem Chip äquivalent ist.

Die Flusszelle wird unterteilt in Referenz- und Messzelle. Die Referenzzelle (F_{c1}) wird mit GST (*1 μ l in 69 μ l HBS-Puffer*) als Negativkontrolle beladen. In der F_{c1} -Zelle beträgt das Signal 1005 RU. Die Messzelle (F_{c2}) wird mit dem GST-SH3-Fusionsproteinen (*Konzentration 10 μ g/ml*) beladen. Nach jeder Messung wird die Messzelle regeneriert (*Glycin pH 2,2 10 mM*) und neu mit GST-Fusionsprotein beladen. Die Signale betragen nach der Beladung bei SH3-Abp1-GST 600 RU, bei SH3-Myo5-GST 630 RU, bei SH3-RVS167-GST 600 RU und bei SH3-Yhr016-GST 820 RU. Die Liganden für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (*KD*) zwischen den 4 SH3-Domänen, werden aus der Auswertung der BLU-Werte der Screeningarrays gewählt. Die zwei Liganden VQQDSLPLPKLPFRSWG (*Interaktionspartner von SH3-RVS167 und SH3-Yhr016*) und ERPKRRAPPPVPKKP (*Interaktionspartner von SH3-Abp1 und SH3-Myo5*) werden in HBS-Puffer (*0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% (w/v) Surfactant P20, Firma BIAcore*) gelöst. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 2 mmol. Sie wird für eine Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:10 verdünnt und davon ausgehend acht mal 1:2 weiter verdünnt.

Die Signaldifferenzen zwischen F_{c1} -Zelle und F_{c2} -Zelle für die Affinitätsmessungen zwischen Antikörper und GST (F_{c1} -Zelle) sowie Liganden und GST-Fusionsproteinen (F_{c2} -Zelle) liegen zwischen 30 und 60 RU. Mit Hilfe der Auswertsoftware BIAevaluation wird für jede Peptid-Domäneninteraktion ein Sensorgramm (Abb. 13) erstellt und der *KD*-Wert bestimmt.

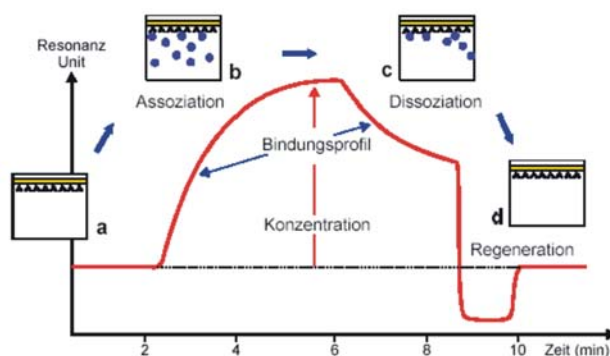


Abb. 13: Schematische Darstellung eines Sensorgrams:

a) Basislinie im Pufferfluss, b) Probeninjektion, Bindung und Signalanstieg, c) Dissoziation, Signalabfall im anschließenden Pufferfluss, d) Regenerierung und entsprechende Basislinie, die Kästchen zeigen die Beladung des Sensorchips

<http://www.biacore.com/technology/how.lasso>

3.5 Verwendete Geräte

Tab. 12: Geräte

Geräte	Bezeichnung, Produktbezeichnung, Firma
Analysenwaage	Satorius basic Satorius, Göttingen
Analytische HPLC	Waters 600E System Controller, Waters 991 Photodiode Array Detector, Waters 470 Scanning Fluorescence Detector, Waters 717plus Autosampler, Pumpe Waters Deutschland
Auto Spot Robot	ASP 222 XL Abimed, Langenfeld
BIACore® X	BIACore, Schweden
E Finn	Aqua, Deutschland
Laserdesorptions	LaserTecBenchtopII PerSeptive, Biosystems, USA
Flugzeitmassenspektrometer (MALDI TOF)	Boehringer, Deutschland
Lumi-Imager™	Lyovac GT 2/GT 2
Lyophilisator	AMS 422 Abimed, Deutschland
Multipler Peptidsynthesizer	CG 840 Schott Geräte, Deutschland
pH Meter	Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech, England
Photometer	Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Waters 625 LC Systems, Pumpe Waters, Deutschland
Präparative HPLC	Firma Fröbel Labortechnik
Schüttler Rocky®	Säulen Sep/a/ra/tions Group, USA
Vydac HPLC	Sep/a/ra/tions Group, USA
Vydac HPLC Säulen	Eppendorf 5415C Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R Heraeus, Deutschland

3.6 Verwendete Software:

Tab. 13: Software

Software	Hersteller
BIAevaluation 4.0	BIACORE, Schweden
CorelDraw 9.0	Corel Corporation, Kanada
Excel 5.0	Microsoft, USA
Genespotter 2.3.5.	MicroDiscovery, Berlin
LISA 1.57	Jerini Bio Tools GmbH, Berlin
MOLMOL 2K.2	Spectrospin AG, Schweiz

3.7 Chemikalien

3.7.1 Reagenzien für die Spotsynthese

Fmoc-Aminosäuren

Tab. 14: Auflistung aller verwendeten Aminosäuren

Code	Aminosäure	M _r (g/ mol)	Code	Aminosäure	M _r (g/ mol)
A	Fmoc-A-OPfp	477.4	N	Fmoc-N(Trt)-OPfp	537.5
D	Fmoc-D(OtBu)-OPfp	577.5	P	Fmoc-P-OPfp	503.4
E	Fmoc-E(OtBu)-OPfp	577.8	Q	Fmoc-Q(Trt)-OPfp	776.8
F	Fmoc-F-OPfp	553.5	R	Fmoc-R(Pbf)-OPfp	814.9
G	Fmoc-G-OPfp	463.2	S	Fmoc-S (tBu)-OPfp	549.5
H	Fmoc-H(Boc)-OPfp	643.6	T	Fmoc-T (tBu)-OPfp	563.5
I	Fmoc-I-OPfp	519.5	V	Fmoc-V-OPfp	505.4
K	Fmoc-K(Boc)-OPfp	634.6	W	Fmoc-W(Boc)-OPfp	692.4
L	Fmoc-L-OPfp	519.5	Y	Fmoc-Y(tBu)-OPfp	625.6
M	Fmoc-M-OPfp	537.5			

Alle AS wurden von der Firma Bachem oder NOVA Biochem erworben.

TBS-Puffer für die Inkubation der CAPE-Membran

TBS 10 fach pH 8,0 (*Tris Buffered Saline*)

80g NaCl (*Firma Merck*)

2g KCl (*Firma Merck*)

61g TRIS (*Trishydroxymethylaminomethan, Firma Merck*)

in 0,8l Aqua dest. lösen, mit konzentrierter Salzsäure (*HCl, Firma Merck*) pH 8,0 einstellen anschließend auf 1l auffüllen.

Blocking-Buffer (*BB*) für die Inkubation der CAPE-Membran

5ml Bl. Buffer (*10 fach*) (*Firma Sigma*)

5ml TBS (*10 fach*)

2,5g Saccharose (*Firma Merck*)

mit destilliertem Wasser auf 50ml auffüllen.

Regenerierungspuffer für die CAPE-Membran

Zitratpuffer für 1l Volumen

1,73g Natriumzitrat (*Firma Merck*) gelöst in destilliertem Wasser

0,413g Citrat (*Firma Merck*) gelöst in destilliertem Wasser
 Natriumhydroxid (*Firma Merck*) 1M, bis sich der pH-Wert 6 einstellt
 Mit destilliertem Wasser auf 1l auffüllen.

3.7.2 Reagenzien für die BIAcore®X

Aminkopplungskit: NHS/ EDC der Firma BIAcore

Beladungskit

Tab. 15: GST-Capturekit der Firma BIACORE

Reagenz	Konzentration
rekombinant GST (<i>S. japonicum</i>)	0,2mg/ml
Ziege-Anti-GST-Antikörper	0,8mg/ml
Regenerierungslösung für GST-Fusionsproteine	Glycin pH 2,2 10mM

4 SH3-Domänen

Die folgende Tabelle zeigt Konzentration und die Position der Domäne in den Proteinen (Tab. 16).

Tab. 16: Konzentrationen der SH3-Fusionsproteine

Fusionsprotein	Lage im Protein	Konzentration
SH3-RVS167-GST	424-ETVT....YVQL-479	0,4 mg/ml
SH3-YHR016016-GST	326-PTAV....VRVS-382	1,4 mg/ml
SH3-Abp1-GST	535-PWAT....VSLG-591	1,0 mg/ml
SH3-Myo5-GST	1088-RMFE....AYMK-1144	1,8 mg/ml

(bereitgestellt von der Forschungsgruppe Cesareni Universität Rom)

Puffer für die BIAcore

Tab. 17: HBS-Puffer BIA *Certified* der Firma BIACORE

Chemikalie	Konzentration
HEPES pH 7,4	0,01 M
NaCl	0,15 M
EDTA	3mM
(w/v) Surfactant P20	0,005%

3.8 Datenauswertung

Die Messdaten werden durch Minimum, Maximum, Mittelwert ausgewertet.

Die Selektivität wird an Hand des Verhältnisses aus ermittelten Bindern nach der Grenzwertsetzung zur Gesamtpeptidzahl ermittelt (*siehe unten beschriebene Formel*) und über das Integral der normalisierten Graphen der vier Arrays.

$$\frac{GP}{100\%} = \frac{PnG}{x}$$

GPZ - Gesamtpeptide

PnG - Peptide nach Grenzwertfestlegung

x - Prozentsatz, nachdem die Einteilung der Domänen nach ihrer Selektivität erfolgt
Die Normalisierung der Mean-Werte der Arrays erfolgt über die untenstehende

Funktion und wird in (Tab. 23 - Tab. 27) als F_{mean} bezeichnet:

$$f(x)=x$$

$$y = \frac{\sum_1^{2953} \text{Mean} - \text{Mean}_{\min}}{\text{Mean}_{\max} - \text{Mean}_{\min}}$$

Die Mean-Werte aller Arrays werden normalisiert und in einem Diagramm graphisch dargestellt (Abb. 18).

Das Integral wird für jeden Graphen aus den F_{mean} -Datensätzen (Tab. 23- Tab. 27) nach folgender Funktion berechnet, um die Selektivität zu bestimmen.

$$f(x)=x$$

$$y = \frac{\sum_1^{2953} \text{Mean}}{2953}$$

Der Wert 2953 entspricht der Anzahl der Peptide auf dem Array.

Alle Berechnungen werden mit dem Programm Excel 5.0 erstellt.

3.9 Grenzwertbestimmung

Damit eine zusätzliche Aussage über die Selektivität der SH3-Domänen getroffen werden kann, wird ein Grenzwert (GW) der Mean-Werte für jede Domäne definiert. Die Bestimmung des Grenzwertes erfolgt visuell anhand der noch wahrnehmbaren Spots. Die zu diesem Spot zugehörige Signalintensität definiert den Grenzwert. Alle Werte, die unterhalb dieses Wertes liegen, werden als nicht repräsentativ definiert. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Schwärzung der Spots und den zugehörigen Mean. Ein dunkler Spot bedeutet somit eine hohe Signalintensität (30).

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Ligand-SH3-Domäneninteraktion

Alle Arrays wurden mit Hilfe der SPOT-Synthese auf einer CAPE-Membran erstellt, und die Peptid-Protein-Interaktion über Chemilumineszenz in einem Detektor visualisiert. Zur Erleichterung der Auswertung wurden je fünf Peptide mit der Sequenz LASDLIVPRR als Markierungen in der oberen linken und rechten Ecke sowie in der unteren rechten Ecke des Arrays synthetisiert. Alle vier Arrays sind identisch in Form und Inhalt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen (Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16 und Abb. 17) zusammengefasst. Die hier abgebildeten Flächen unterhalb der Graphen geben die gemessenen Signalintensitäten aller Ligand-Domäneninteraktion wieder. Sie sind äquivalent zur Anzahl der Ligand-Domäneninteraktion, über die die Selektivität bestimmt wurde.

4.1.1 SH3-Domänen von Myo5 und Abp1

Auf dem Peptid-Array, welches auf die Bindung zur SH3-Domäne von Myo5 (Abb. 14) getestet wurde, zeigten sich deutlich die 15 Markierungspeptide. Das Minimum betrug für diese Peptide 1481 Mean, und das Maximum lag bei 3738 Mean. Es ergab sich ein Mittelwert von 2420 Mean. Die Beladung der Membran betrug 16 nmol/ cm². Weiter zeigte sich auf der Membran eine Vielzahl von Spots mit verschiedenen intensiven Ausprägungen. Als Grenzwert (GW) (*siehe* 3.9) wurde eine Signalintensität von 404 Mean bestimmt, damit konnten für die Myo5-SH3-Domäne 354 Peptide als (*positive*) Binder bestimmt werden.

Die Auswertung der Interaktion zwischen dem Peptid-Array und der SH3-Domäne von Abp1 (Abb. 15) zeigte alle 15 Markierungspeptide. Ihr Minimum lag bei 1257 Mean, das Maximum lag bei 3312 Mean und der Mittelwert zeigte einen Wert von 2110 Mean. Die Membran hatte eine Beladung von 20 nmol/ cm². Der Grenzwert lag für die Abp1-SH3-Domäne 449 Mean, und es wurden 159 positive Binder ermittelt.

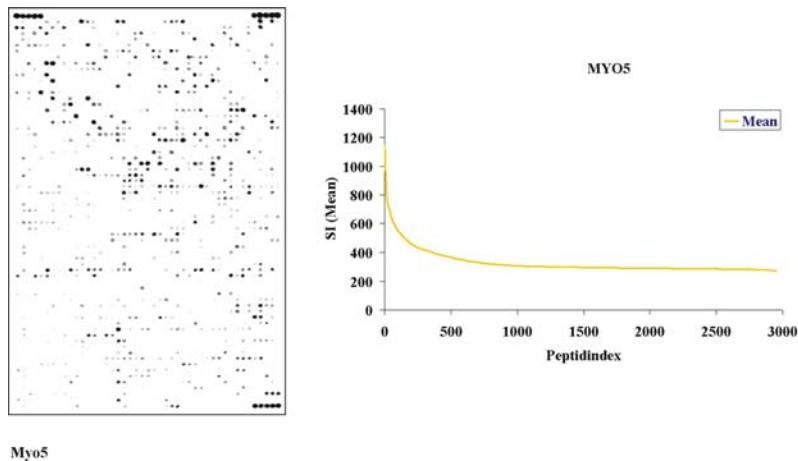


Abb. 14: **Darstellung des Screeningarrays der Myo-SH3-Domäne:** **Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Peptidbibliothek mit 2953 15-meren-Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) hergestellt und auf Bindung mit zur Myo5-SH3-Domäne analysiert. Die sichtbaren Spots zeigen eine Interaktion zur jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **oranger Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum.

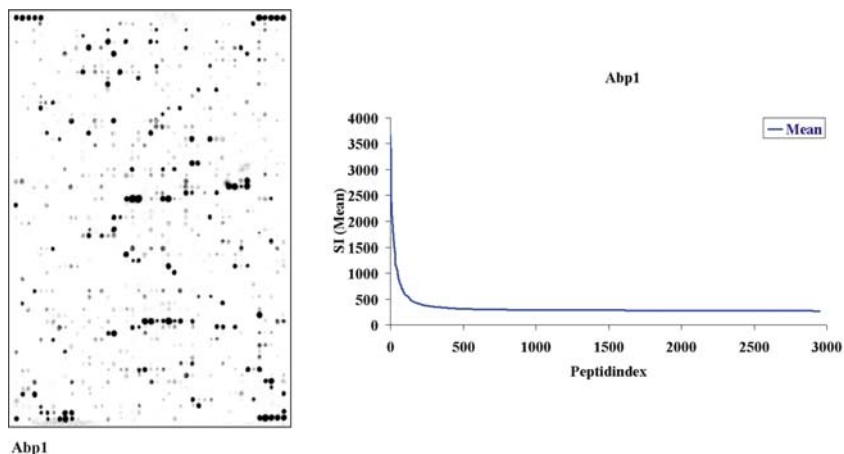


Abb. 15: **Darstellung des Screeningarrays der Abp1-SH3-Domäne:** **Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Peptidbibliothek mit 2953 15-meren-Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) hergestellt und auf Bindung mit zur Abp1-SH3-Domäne analysiert. Die sichtbaren Spots zeigen eine Interaktion zur jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **blauer Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum.

Die Myo5-SH3-Domäne erkannte somit 12% aller 2953 Peptide, während es bei der Abp1-SH3-Domäne 5,4% waren (siehe 3.8.). Das Integral (siehe 3.8.) der Kurve in der Auswertung des Myo5-SH3-Arrays wurde mit dem Wert 0,068 und

für den Abp1-SH3-Array mit 0,018 bestimmt. Um die beiden Domänen näher charakterisieren zu können, wurde nach Liganden gesucht, die als Binder sowohl für Myo5-SH3- als auch für Abp1-SH3-Domäne in Frage kommen. 24 Übereinstimmungen (Tab. 31) konnten ermittelt werden. Es wurde ein Liganden gesucht, der bei beiden Domänen einen hohen Mean-Wert aufwies. Der Ligand ERPKRRAPPPVPKKP erfüllte diese Bedingungen mit einem Mean-Wert von 676 (*Myo5-SH3, Array-SI-Maximum 1150 Mean*) und 1594 (*Abp1-SH3, Array-SI-Maximum 3660 Mean*) und wurde für weitere Untersuchungen mittels Affinitätsmessung, Substitutions- und Längenanalyse verwendet. Die Sequenz ERPKRRAPPPVPKKP ist ein Teil der Primärstruktur aus dem Hypothetischen 74.8 kDa Protein in der BET1-PAN1 intergenic Region.

4.1.2 SH3-Domänen von Rvs167 und Yhr016

Das Peptid-Array, welches auf die Bindung zur SH3-Domäne von Rvs167 (Abb. 16) untersucht wurde, zeigte die Markierungspeptide deutlich und vollzählig. Das Minimum ihrer Signalintensitäten lag bei 1118 Mean, und das Maximum wies einen Wert von 4339 Mean auf. Der Mittelwert zeigte einen Wert von 2437 Mean. Die Beladung der Membran betrug 27 nmol/ cm². Es waren nur wenige Spots zu erkennen. Der Grenzwert (*siehe 3.9*) lag für die Rvs167-SH3-Domäne bei 446 Mean. Es konnten 51 positive Binder ermittelt werden.

Nach der Auswertung des Peptidarray auf die Interaktionen mit der SH3-Domäne von Yhr016 (Abb. 17) waren ebenfalls alle 15 Markierungspeptide deutlich zu erkennen. Das Minimum dieser Peptide lag bei 686 Mean. Das Maximum wurde bei einer Intensität von 3277 Mean ermittelt und der Mittelwert lag bei 2176 Mean. Die Membran hatte eine Beladung von 18 nmol/ cm². Es konnten nur wenige unterschiedlich intensive Spots auf der Membran detektiert werden. Für die Yhr016-SH3-Domäne wurde ein Grenzwert mit einer Signalintensität von 438 Mean ermittelt. Mit dem Grenzwert (*siehe 3.9*) konnten positive 65 Liganden analysiert werden.

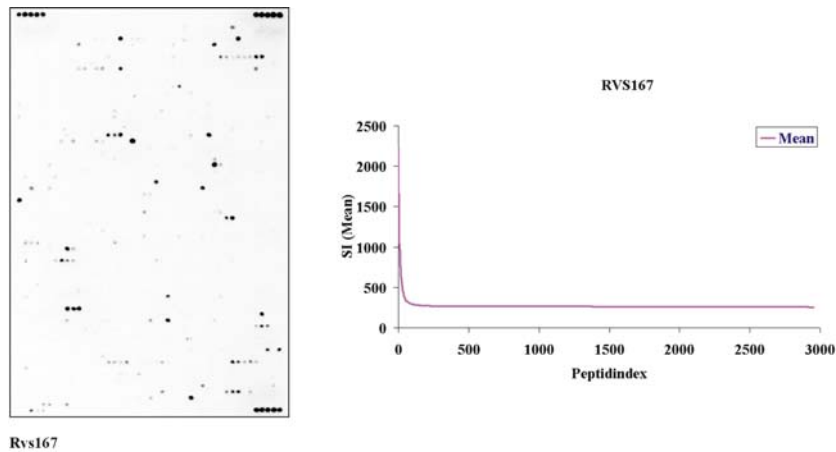


Abb. 16: **Darstellung des Screeningarrays der Rvs167-SH3-Domäne:** **Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Peptidbibliothek mit 2953 15-meren-Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) hergestellt und auf Bindung mit zur Rvs167-SH3-Domäne analysiert. Die sichtbaren Spots zeigen eine Interaktion zur jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **pinker Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum.

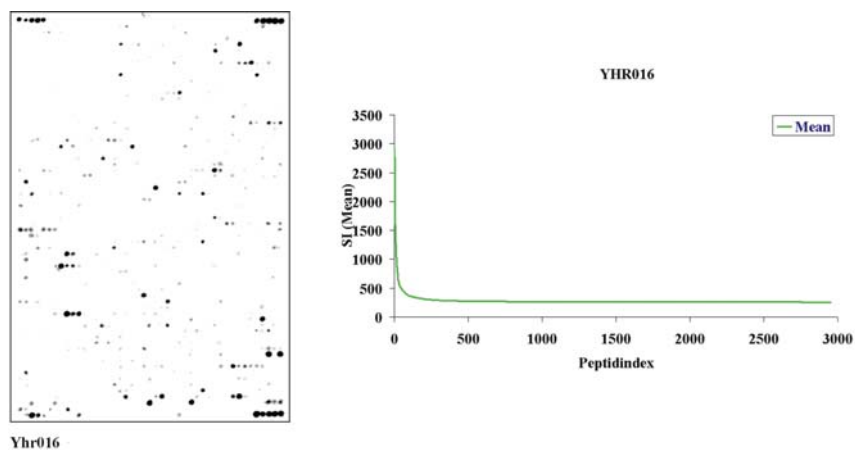


Abb. 17: **Darstellung des Screeningarrays der Yhr016-SH3-Domäne:** **Linke Abbildung:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Peptidbibliothek mit 2953 15-meren-Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) hergestellt und auf Bindung mit zur Yhr016-SH3-Domäne analysiert. Die sichtbaren Spots zeigen eine Interaktion zur jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **grüner Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum.

Von 2953 Liganden erkannte die Yhr016-Domäne 2,2% während die Rvs167-Domäne 1,7% erkannte (*siehe 3.8.*). Das Integral (*siehe 3.8.*) wurde für Yhr016-SH3 mit einem Wert von 0,01 und für Rvs167-SH3 mit einem Wert von 0,009

bestimmt. Anhand der ermittelten Grenzwerte konnten 12 gemeinsame Binder (Tab. 31) ermittelt werden. Dabei wurde der Ligand VQQDSLPLKLPFRSWG für weitere Untersuchungen der beiden Domänen (Affinitätsmessung, Längen- und Substitutionsanalyse) ausgewählt. VQQDSLPLKLPFRSWG ist ein Teil der Primärsequenz aus dem Protein General amino acid permease AGP2. Die Signalintensitäten betrugen für Yhr016-SH3 916 Mean (*Array-SI-Maximum* 2953) und für Rvs167-SH3 999 Mean (*Array-SI-Maximum* 2238) für die Interaktion mit diesem Liganden.

4.1.3 Gesamtauswertung der vier Screeningarrays

Es zeigte sich, dass der Mittelwert der Markierungspeptide zwischen 2110 und 2437 Mean nur geringfügig abweicht. Der Vergleich der vier Domänen (Tab. 18) in Hinblick auf ihre Neigungen aus den 2953 Peptiden einen individuellen Satz von Liganden zu erkennen, wurde als Selektivität definiert. Die Einteilung der untersuchten Domänen in selektiv oder promiskuitiv erfolgte anhand des Integrals und des Verhältnisses der Anzahl der individuell erkannten Peptide zu der Gesamtzahl der Peptide. Zusätzlich wurden die normalisierten Mean-Werte der SH3-Domänen (Abb. 18) graphisch dargestellt.

Tab. 18: Zusammenfassung

	Myo-SH3	Abp1-Sh3	Yhr016-SH3	Rvs167-SH3
Minimum-Mark.peptid-Mean	1481	1259	686	1118
Maximum-Mark.peptid-Mean	3738	3312	3277	4339
Mittelwert in Mean	2420	2110	2176	2437
Grenzwert in Mean	404	449	438	446
Binderzahl	354	159	65	51
Übereinstimmungen	24	24	-	-
	-	-	12	12
Selektivität in %	12	5,4	2,2	1,7
Integral	0,068	0,018	0,01	0,009

Aufgrund des Vergleiches zwischen Prozentsätzen der erkannten Peptide zu dem Anteil der Gesamtpeptide und der Flächen unterhalb der Graphen in (Abb. 18), wurde folgende Einteilung nach steigender Selektivität festgelegt:

Myo5-SH3 (0,068/ 12%) < Abp1-SH3 (0,018/ 5,4%) < Yhr-SH3 (0,01/ 2,2%) < Rvs167-SH3 (0,009/ 1,7%).

Es wurden 24 übereinstimmende Liganden für Myo5- und Abp1-SH3 ermittelt sowie 12 für Rvs- und Yhr-SH3. Der Vergleich der Sequenzen aller vier SH3-Domänen nach der Festlegung des Grenzwertes ergab, dass es keinen Ligand

gab, der von allen Domänen erkannt wurde.

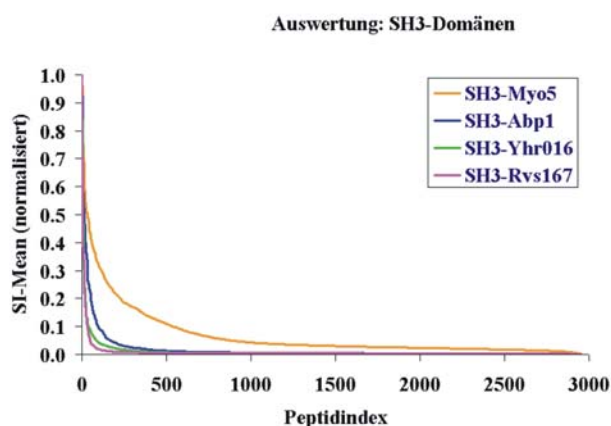


Abb. 18: **Vergleich der SI (Mean) der gesamten SH3-Domänenarrays:** Vergleich der Selektivitäten anhand der Flächen unter den jeweiligen Graphen der SH3-Domänen von **Myo5 (orange)**, **Abp1 (blau)**, **Yhr016 (grün)** und **Rvs167 (pink)**. Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden von Maximum zu Minimum geordnet, normalisiert und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide aufgetragen

4.2 Charakterisierung der ausgewählten Liganden der vier SH3-Domänen

Damit eine Aussage über das Bindungsverhalten der Domänen getroffen werden konnte, wurden die beiden ermittelten Liganden aus den Bindungsstudien mit Hilfe der Substitutions- und Längenanalyse und Oberflächenplasmonresonanz näher untersucht.

Die Substitutions- und Längenanalyse der Liganden wurden auf einer CAPE-Membran mit Hilfe der SPOT-Synthese erstellt. Die Auswertung erfolgte mit einem Chemilumineszenzsystem in einem Detektor und der Software Genespotter. Die Bezeichnung der Kernaminosäuren erfolgte nach dem ASCII-Kode (Tab. 19) (48).

Tab. 19: Beschreibung des Konsensusmotivs mit ASCII

Symbole	Beschreibung
x	beliebige Aminosäure (AS)
%	hydrophobe AS
@	aromatische AS
&	hydrophile AS
[+]	positiv geladene AS
[-]	negativ geladene AS
#	aliphatische AS

4.2.1 ERPKRRAPPPVPPKKP als Myo5-SH3-Domänenligand

Auf dem oberen großen Abschnitt der Membran ist die Substitutionsanalyse abgebildet (Abb. 19). Der Wildtyp(wt)-Ligand wurde auf der Membran in der ersten Spalte vollständig und mit deutlichen schwarzen Spots abgebildet. Alle Spots der Wildtypamino-säuren konnten mit ähnlicher Schwärzung in den Spalten A bis Y (2 bis 20) erkannt werden. Die Substitution zeigte in den Positionen -8 bis -2 kein erkennbares Motiv, während ein Muster im Bereich der Position -1 bis 3 zu erkennen war. Hier waren nur wenige Substitutionsmöglichkeiten für die L-Aminosäuren möglich, dort wo keine bzw. schwach abgebildete Spots zu erkennen waren, konnte die wt-Aminosäure nicht ersetzt werden. Die Positionen 3 bis 5 zeigten ebenfalls kein Motiv.

Ausgehend von der Definition nach Aasland wurde das erste Prolin im Kernmotiv mit 0 bezeichnet, die weitere Nummerierung der Schlüsselamino-säuren erfolgte zum N-Terminus mit einem negativen Vorzeichen und zum C-Terminus mit einem positiven Vorzeichen.

Aus der Sequenz ERPKR₄R₃A₂P₁P₀P₁V₂P₃KKP war nur die hervorgehobene Teilsequenz von Interesse. Die **Positionen -1, P0 und P3** stellten Schlüsselamino-säuren dar, die durch keine andere Aminosäure ersetzt werden konnten, außer durch sich selbst. Arginin an der **Position -4** konnte durch die hydrophoben Aminosäuren F, H, I, K, L, M und W sowie durch die polaren Aminosäuren N und Q ersetzt werden. In der **Position -3** waren als Substitutionsanaloge zu R die hydrophoben Aminosäuren A, I, V und W möglich. Alanin an der **Position -2** konnte durch die hydrophoben Aminosäuren K, L, M, und P sowie durch die polaren Aminosäuren N ersetzt werden. Die **Position 1** konnte durch eine große Zahl von Aminosäuren ersetzt werden. Die Ausnahme bildeten hier die aromatischen Aminosäuren F; W und Y sowie die polaren Aminosäuren mit endständigen OH-Gruppen T und der aliphatischen Aminosäure V durch die P nicht ausgetauscht werden kann. Die **Position 2** zeigte eine hohe Präferenz für die aliphatische Aminosäuren I und L sowie für P. Zusammenfassend lautet das Konsensusmotiv:

(R₄ [HIKLMVW]) (R₃ [IVW]) (A₂ [KLMPN]) (P₋₁) (P₀) (x) (V [ILP]) (P₃),

nach ASCII (48): %%%PPx%P

Das Peptid ERPKRRAPPPVPPKKP konnte nicht sicher zu den Klasse 1

Liganden ($R_{-3}xxP_{0}xxP_3$) zugeordnet werden, da R_{-3} durch weitere Aminosäuren ersetzt werden konnte. Eine Tendenz zum $RxxPxxP$ -Motiv, wie sie unterstrichen in der Peptidsequenz dargestellt ist, lässt sich nicht verkennen.

Der KD-Wert bezeichnet die Konzentration bei Halbsättigung. Die graphische Auswertung ist in der (Abb. 19) zu entnehmen. Es wurde ein KD-Wert von 3,6 μ M gemessen.

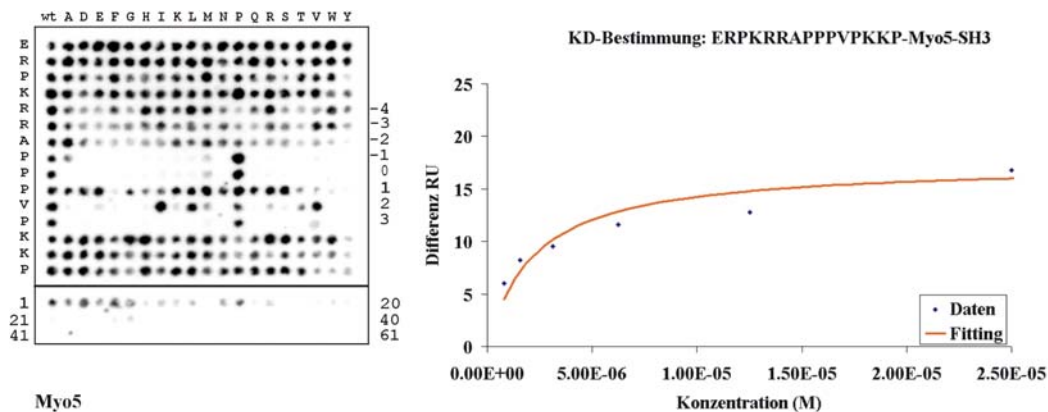


Abb. 19: **Darstellung der Substitutions-/ Längenanalyse nach der Auswertung im Lumi-Imager und graphische Darstellung der Affinität zwischen Ligand und Myo5-SH3:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurden die Membranen erstellt. Nach der Inkubation mit der jeweiligen Domäne und dem Antikörperset stellten sich nach der Auswertung die abgebildeten Muster dar. **Linke Abbildung:** Substitutionsanalyse (obere Fläche): In der ersten Spalte wurde der Wildtyp (wt) synthetisiert. Jede Aminosäure des Liganden wurde durch 19 L-Aminosäuren ersetzt (außer C) damit jene Schlüsselaminosäuren erkannt werden. **Längenanalyse** (untere Fläche): Der Ligand wurde nacheinander N- und C-terminal bis auf eine Länge von 5 Aminosäureresten gekürzt. **Rechte Abbildung:** Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Resonanzunit zur gegebenen molaren Konzentration: blaue Vierecke: sind die Signale zu der jeweiligen Konzentration, orange Linie: gemittelter Graph zwischen den einzelnen Signalen. Der KD-Wert wird unter zu Hilfenahme des Programms BIAevaluation aus den abgebildeten Werten errechnet (siehe ab 3.4).

Die Längenanalyse (Abb. 19) wurde unterhalb der Substitutionsanalyse parallel erstellt, damit die Mindestlänge des Liganden gesucht werden konnte, die für die Ligand-Proteininteraktion benötigt wurde. Das Ergebnis der Längenanalyse zeigte 13 schwach gefärbte Spots, wobei nur die ersten 11 (*Position 1-6, 8-10 sowie 12 und 13*) bewertet wurden, da der 13. Spot den letzten sich deutlich abbildenden Punkt darstellte. Die Flächen, wo keine schwarzen Spots abgebildet wurden, wiesen Sequenzkürzungen auf, die von der Domäne nicht erkannt wurden. Der Ligand ERPKRRAPPPVPKKP der SH3-Domänen von Myo5

wurde kontinuierlich bis auf eine Länge von 5 Aminosäuren vom N- und C-Terminus aus gekürzt, und das Längenmotiv in Bezug auf die abgebildeten Spots ausgewertet. Die Sequenzen der gesamten Analyse des Liganden für die SH3-Domänen Myo5 wurde in (Tab. 29) zusammengefasst.

Die Auswertung der Längenanalyse für den Liganden von Myo5-SH3 ergab ein Minimalepitop von 11 AS mit der Sequenz PKRRAPPPVPK.

4.2.2 ERPKRRAPPPVPKKP als Abp1-SH3-Domänenligand

Die Substitutionsanalyse ist im oberen Abschnitt der Membran abgebildet (Abb. 20). In der ersten Spalte zeigte sich der wt-Ligand vollständig und mit deutlichen Spots. Die Spots der Aminosäuren in der Substitutionsanalyse zeigten in den Spalten A bis Y (2 bis 20) ähnliche Schwärzungen und Größen wie die des Wildtyps.

In den Positionen -8 bis -4 konnte kein Muster erkannt werden. Der Bereich -3 bis 5 zeigte ein sich schwach abzeichnendes Motiv, während die Position 6 kein Motiv erkennen ließ. Weiße Flächen bzw. schwachgefärbte Spots in der Substitutionsanalyse stellten Bereiche dar, wo keine Aminosäure im Wildtyp ersetzt werden konnte. Es wurden nur die nummerierten Positionen ERPKR₄R₃A₂P₋₁P₀P₁V₂P₃K₄K₅P näher untersucht.

Die **Position -4** konnte durch die meisten Aminosäuren substituiert werden. Die Ausnahmen bildeten die polaren Aminosäuren G und N sowie die hydrophoben Aminosäuren P und Y. In der **Position -3** konnte R durch die hydrophoben Aminosäuren A, F, G, H, I, K, T, W ersetzt werden. Die **Position -2** konnte durch alle Aminosäuren außer P ersetzt werden. In der **Position -1** zeigte sich eine Bevorzugung zur Substitution der wt-Aminosäuren durch die polaren Aminosäuren G und S sowie von hydrophoben Aminosäuren A, F, H, I, K, L und R. Die Substitution in der **Position 1** erfolgte durch die polaren Aminosäuren D und E sowie durch die hydrophoben Aminosäuren A, F, H, I, K, L, M und V. Die **Position 2** konnte durch die aliphatischen Aminosäuren I, K, und L ersetzt werden. Eine Bevorzugung in der **Position 4** zur Substitution von K zeigten die polaren Aminosäuren D, Q, S und T und die hydrophoben Aminosäuren A, P, R und V. In den **Positionen 0, 3, und 5** zeigen sich kaum Austauschmöglichkeiten für P und K. Es konnten nur wenige Aminosäuren substituiert werden. In der **Position 0** erfolgte eine Substitution nur durch die

kurzkettige und hydrophobe Aminosäure Alanin. Die **Position 3** wurde durch die positiv geladenen Aminosäuren R und K sowie durch die polaren Aminosäuren A und G ersetzt, während die **Position 5** nur durch die positiv geladene Aminosäure R ersetzt werden konnte. Die Auswertung der Substitutionsanalyse (Abb. 20) für den Liganden zeigte keine Bevorzugungen für die markierten Aminosäuren im Wildtypliganden (wt). Ein deutliches Bindungsmotiv wie unter 4.2.1 konnte nicht erkannt werden. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte in Anlehnung der Nomenklatur nach Aasland (48) **R₄R₃A₂P₁P₀P₁V₂P₃K₄K₅**. Aus Substitutionsanalysen leitete sich das Konsensusmotiv für diesen Liganden ab:

(x₄) (R₃[AFGHIKTW]) (x₂) (P₁ [GSAFHIKLMV]) (P₀/A) (x₁) (V₂[IKL]) (P₃[AGKR]) (K₄[DQSTAPRV]) (K₅/R). nach ASCII (48): %x%P/Ax#P/-AGKR%[+]. Der Liganden wurde der spezifischen Klasse K2 (16) (PxxPx[+]) zu geordnet. Der KD-Wert lag bei 3,7 µM. Die Beziehung RU_{diff} zur Konzentration wurde in (Abb. 20) dargestellt.

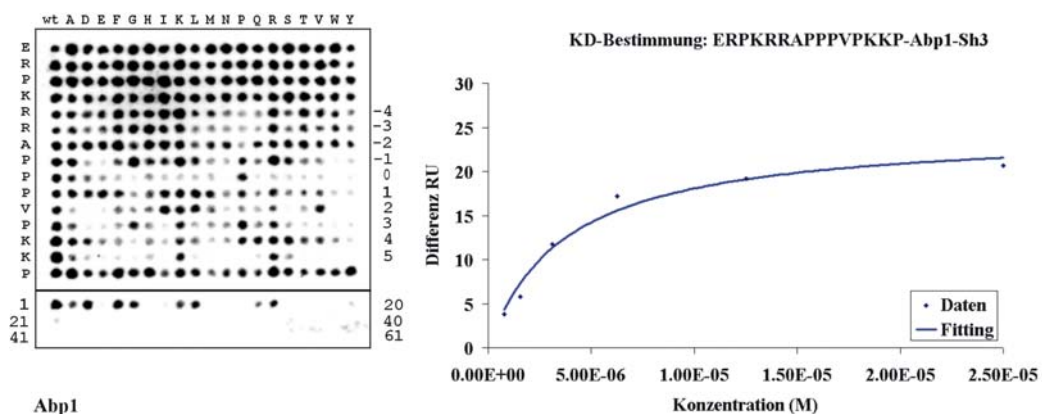


Abb. 20: **Darstellung der Substitutions-/ Längenanalyse nach der Auswertung im Lumi-Imager und graphische Darstellung der Affinität zwischen Ligand und Abp1-SH3:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurden die Membranen erstellt. Nach der Inkubation mit der jeweiligen Domäne und dem Antikörperset stellten sich nach der Auswertung die abgebildeten Muster dar. **Linke Abbildung:** Substitutionsanalyse (obere Fläche): In der ersten Spalte wurde der Wildtyp (wt) synthetisiert. Jede Aminosäure des Liganden wurde durch 19 L-Aminosäuren ersetzt (außer C) damit konnten Schlüsselaminosäuren erkannt werden. **Längenanalyse** (untere Fläche): Der Ligand wurde nacheinander N- und C-terminal bis auf eine Länge von 5 Aminosäureresten gekürzt. **Rechte Abbildung:** Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Resonanzunit zur gegebenen molaren Konzentration: blaue Vierecke: sind die Signale zu der jeweiligen Konzentration, blaue Linie: gemittelter Graph zwischen den einzelnen Signalen. Der KD-Wert wird unter zu Hilfenahme des Programms BIAevaluation aus den abgebildeten Werten errechnet (siehe ab 3.4).

Mit der Längenanalyse wurde nach der Mindestlänge des Liganden gesucht, die für die Ligand-Proteininteraktion nötig war. Im Ergebnis zeigten sich 9 deutlich gefärbte Spots an den Positionen 1 bis 3, 5 und 6, 9 und 10 sowie 14 und 15. Die Flächen, auf denen keine Spots abgebildet waren, wiesen Kürzungen auf, die von der Domäne nicht mehr erkannt wurden. Der Ligand ERPKRRAPPPVPKKP der SH3-Domänen von Abp1 wurde kontinuierlich bis auf eine Länge von 5 Aminosäuren vom N- und C-Terminus aus gekürzt, und das Längenmotiv in Bezug auf die abgebildeten Spots ausgewertet. Die gesamten Sequenzen der Analyse sind in (Tab. 29) zusammengefasst. Nach der Auswertung zeigte sich eine Mindestlänge von 11 AS mit der Sequenz RRAPPPVPKKP (Abb. 20).

4.2.3 Zusammenfassung der Charakterisierung von ERPKRRAPPPVPKKP

Zusammenfassend zeigt die Auswertung (Tab. 20, *orange*) der Substitutionsanalyse von ERPKRRAPPPVPKKP für Myo5-SH3, dass ein Kernmotiv zu erkennen war. Der Ligand lässt sich der Klasse 1 zuordnen.

In der Auswertung der Längenanalyse zeigt sich, dass eine Mindestlänge von 11 Aminosäuren für die Ligandenerkennung nötig ist. Die Auswertung (Tab. 20, *blau*) der Substitutionsanalyse von Abp1-SH3 ergab kein definiertes Konsensusmotiv über den gesamten spezifischen Bereich. Der Ligand konnte dennoch in die Klasse K2 eingeordnet werden. Die minimale Länge, die für eine Interaktion benötigt wird, konnte mit Hilfe der Längenanalyse auf 11 AS festgelegt werden. Nach Auswertung der Dissoziationskonstanten zeigte sich, dass die KD-Werte des Liganden ERPKRRAPPPVPKKP für Myo5-SH3 und Abp1-SH3 3,7 und 3,6 μM betrugen. Die KD-Werte der Liganden liegen in einem für SH3-Domänen typischen Bereich von 1-100 μM .

Tab. 20: Zusammenfassung der Charakterisierung von ERPKRRAPPPVPKKP

	Myo5-SH3	Abp1-SH3
Min in Mean (Array)	271	267
Max in Mean (Array)	1150	3660
SI-Peptid in Mean (Array)	676	1597
	R ₋₄ (HIKLMVW)	R ₋₄ (x ohne G,N,P,Y)
	R ₋₃ (IVW)	R ₋₃ (AFGHIKTW)
	A ₋₂ (KLMPN)	A ₋₂ (x ohne P)
	P ₋₁	P ₋₁ (GSAFHIKLMV)
	P ₀	P ₀ /A
Positionen	P ₁ (x ohne F,T,V,W,Y)	P ₁ (x ohne G,N,Q,S,T,W,Y)
	V ₂ (ILP)	V ₂ (IKL)
	P ₃	P ₃ (AGKR)
		K ₄ (DQSTAPRV)
		K ₅ /R

	Myo5-SH3	Abp1-SH3
Konsensus	%%%PPx%P	%x%P/Ax#P/AGKR%[+]
Klasse	R1	K2
KD-Wert	3,6 μ M	3,7 μ M
Minimallänge	11 AS: PKRRAPPPVPK	11 AS: RRAPPPVPKPK

4.2.4 VQQDSLPLPFRSWG als Rvs167-SH3-Domänenligand

In der oberen Fläche der (Abb. 21) ist die Substitutionsanalyse von VQQDSLPLPFRSWG dargestellt. In der ersten Spalte wurde der Wildtyp deutlich und vollständig abgebildet. Die Spots der Wildtypamino­säuren konnten alle in den Spalten A bis Y (2 bis 20) widererkannt werden.

Die Positionen –6 bis –1 zeigten kein erkennbares Muster. In dem Bereich 0 bis 6 zeigte sich ein Motiv, während die Positionen 7 bis 9 kein Motiv erkennen ließen. Die Spots zeigten in der Substitutionsanalyse, dass hier die Wildtypamino­säure ausgetauscht werden konnte. Dort wo keine bzw. schwach abgebildete Spots in der Analyse zu sehen waren, konnte die jeweilige Aminosäure im Wildtyp nicht substituiert werden.

Die Nummerierung der Positionen der Aminosäuren des Liganden erfolgte nach der Nomenklatur von Aasland (48) VQQDSL_P₀K₁L₂P₃F₄R₅SWG.

Die **Position 0, 2, 3** und **5** bestimmen die Schlüsselamino­säuren P, L, P und R. Diese Aminosäuren konnten durch keine der 19 Aminosäuren ersetzt werden, außer durch sich selbst. Die **Positionen 1** zeigte Präferenzen für die hydrophoben Aminosäuren M, P, Q, R, und T, während an der **Position 4** F durch die hydrophoben Aminosäuren A, K, P, und R substituiert werden konnte. Auffällig ist, dass K₁ und F₄ in Bezug auf die Schwärzung ihrer Spots nicht die besten Besetzungen waren. Einige Substituenten (*M, P, Q, R und T*) für die Positionen 1 und 4 zeigten eine stärkere Schwärzung. Sie waren scheinbar besser affine Binder als der wt-Ligand.

Das Konsensusmotiv konnte als (**P**₀) (**K**₁[*MPQRT*]) (**L**₂) (**P**₃) (**F**₄[*AKPR*]) (**R**₅) und in Form nach ACSII (48) als **P%LP%R** definiert werden. Die Sequenz zeigte das typische Motiv der Klasse R2 (*xP₀xxP₃xR₅*).

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten zwischen Ligand und Domäne ergab einen KD-Wert von 490 μ M.

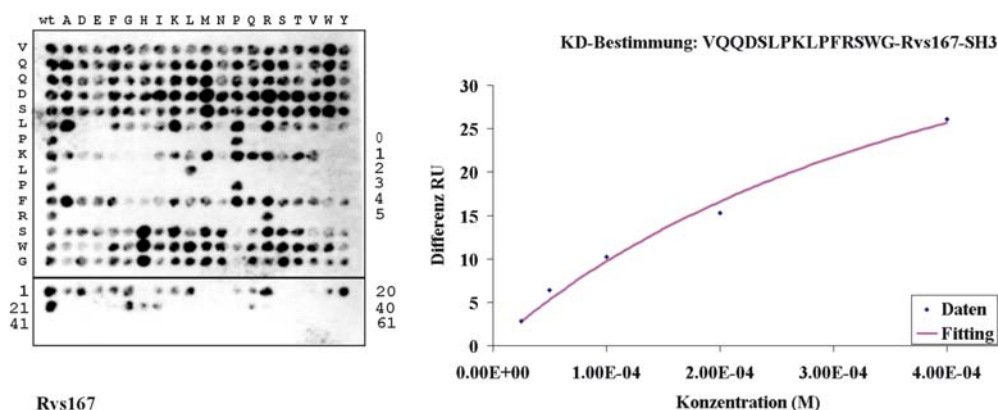


Abb. 21: **Darstellung der Substitutions-/ Längenanalyse nach der Auswertung im Lumi-Imager und graphische Darstellung der Affinität zwischen Ligand und SH3-Domäne:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurden die Membranen erstellt. Nach der Inkubation mit der jeweiligen Domäne und dem Antikörperset, stellten sich nach der Auswertung die abgebildeten Muster dar. **Linke Abbildung: Substitutionsanalyse** (obere Fläche): In der ersten Spalte wurde der Wildtyp (wt) synthetisiert. Jede Aminosäure des Liganden wurde durch 19 L-Aminosäuren ersetzt (außer C) damit konnten Schlüsselaminosäuren erkannt werden. **Längenanalyse** (untere Fläche): Der Ligand wurde nacheinander N- und C-terminal bis auf eine Länge von 5 Aminosäureresten gekürzt. **Rechte Abbildung:** Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Resonanzunit zur gegebenen molaren Konzentration: blaue Vierecke: sind die Signale zu der jeweiligen Konzentration, pinke Linie: gemittelter Graph zwischen den einzelnen Signalen. Der KD-Wert wird unter zu Hilfenahme des Programms BIAevaluation aus den abgebildeten Werten errechnet (siehe ab 3.4).

Das Ergebnis der Längenanalyse ist unter der Substitutionsanalyse abgebildet (Abb. 21). Der Ligand wurde kontinuierlich vom N- und C-Terminus her gekürzt bis auf eine Länge von fünf Aminosäuren. Es wurden 19 Spots mit unterschiedlicher Schwärzung abgebildet. Die Spots der Positionen 1 bis 6, 8 bis 10, 14 bis 15, 19 bis 21 und 26 wurden für die Auswertung verwandt (Tab. 30). Die Daten ergaben ein RVS167 bindendes Peptid mit der minimalen Länge von 9 AS und der Sequenz SLPKLPFRS. Die freien Bereiche zwischen den abgebildeten Spots stellten Verkürzungen dar, die nicht zu einer Interaktion führten.

4.2.5 VQDSLPLKLPFRSWG als Yhr016-SH3-Domänenligand

Der obere Abschnitt in der (Abb. 22) zeigt die Substitutionsanalyse von VQDSLPLKLPFRSWG. In der ersten Spalte wurde der Wildtyp deutlich und vollständig abgebildet. Die Spots der Wildtypaminosäuren konnten alle in den Spalten A bis Y (2 bis 20) widererkannt werden.

Die Positionen –6 bis –1 zeigten kein erkennbares Muster. In den Bereichen 0, 2 und 3 sowie im Bereich 5 zeigte sich ein Motiv, während in den Positionen 1, 4 und 6 bis 7 kein Motiv zu erkennen war. Die dunklen Spots zeigten in der Substitutionsanalyse, dass hier die Wildtypamino­säure ausgetauscht werden konnte. Dort wo keine bzw. schwach abgebildete Spots in der Analyse zu sehen waren, konnte die jeweilige Aminosäure im Wildtyp nicht substituiert werden.

Die Auswertung der Substitutionsanalyse von VQQDSL**P**₀**K**₁**L**₂**P**₃**F**₄**R**₅SWG zeigte, dass die **Positionen 0, 2, 3 und 5** mit den Schlüsselamino­säuren P, L, P und R besetzt waren. Die **Position 1** kann durch fast alle natürlichen L-Aminosäuren ersetzt werden. Die Ausnahme bildeten die aromatischen Aminosäuren F, W, und Y sowie die kurzkettige Aminosäure G. Die **Position 4** tolerierte nahezu alle Aminosäuren außer W und Y.

Der Konsensus lautet (**P**₀) (**K**₁[*x ohne G, F, W, Y*]) (**L**₂) (**P**₃) (**F**₄[*x ohne W, Y*]) (**R**₅) nach ASCII (48) **PxLPxR** und definierte den Klasse-2-Liganden (*xP₀xxP₃xR₅*). Der KD-Wert wurde zu 75 µM bestimmt.

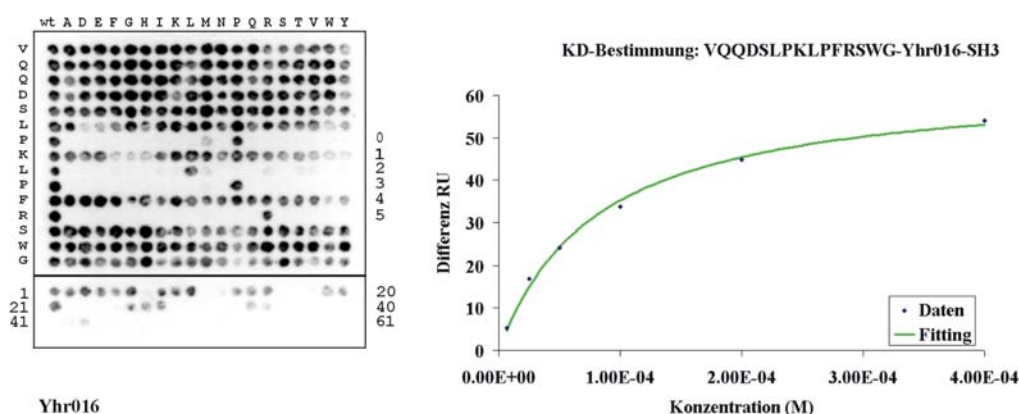


Abb. 22: **Darstellung der Substitutions-/ Längenanalyse nach der Auswertung im Lumi-Imager und graphische Darstellung der Affinität zwischen Ligand und SH3-Domäne:** Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurden die Membranen erstellt. Nach der Inkubation mit der jeweiligen Domäne und dem Antikörperset stellten sich nach der Auswertung die abgebildeten Muster dar. **Linke Abbildung: Substitutionsanalyse** (obere Fläche): In der ersten Spalte wurde der Wildtyp (wt) synthetisiert. Jede Aminosäure des Liganden wurde durch 19 L-Aminosäuren ersetzt (außer C) damit konnten Schlüsselamino­säuren erkannt werden. **Längenanalyse** (untere Fläche): Der Ligand wurde nacheinander N- und C-terminal bis auf eine Länge von 5 Aminosäureresten gekürzt. **Rechte Abbildung:** Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Resonanzunit zur gegebenen molaren Konzentration: blaue Vierecke: sind die Signale zu der jeweiligen Konzentration, grüne Linie: gemittelter Graph zwischen den einzelnen Signalen. Der KD-Wert wird unter zu Hilfenahme des Programms BIAevaluation aus den abgebildeten Werten errechnet (siehe ab 3.4).

Die Längenanalyse ist unter der Substitutionsanalyse dargestellt (Abb. 22). Dabei wurde der Ligand kontinuierlich vom N- und C-Terminus her gekürzt bis auf eine Länge von fünf Aminosäuren. Es wurden 21 Spots abgebildet, wobei die Positionen 1 bis 6, 8 bis 10, 13 bis 15, 19 bis 21 und 26 bis 28 für die Ergebnisbildung relevant waren. Die Auswertung der Sequenzen (Tab. 30) ergab eine Minimallänge von 9 AS mit der Sequenz PKLPFRSWG.

4.2.6 Zusammenfassung der Charakterisierung von VQQDSLPLKLPFRSWG

Die Auswertung der Substitutionsanalyse ergaben für den Liganden von Yhr016-SH3 und Rvs167-SH3 das Konsensusmotiv **PxLPxR** bzw. **P%LP%R** und die Klassenzugehörigkeit Klasse R2.

Die Analyse der Längenbestimmung des Liganden für die beiden Domänen ergab eine Mindestlänge von 9 AS.

Die Auswertung der KD-Wertmessung zeigte einen Wert von 75µM für den Liganden von Yhr016-SH3 und für den Rvs167-SH3 Liganden 490µM.

Tab. 21: Zusammenfassung der Charakterisierung von VQQDSLPLKLPFRSWG

	Yhr016-SH3	Rvs167-SH3
Min in Mean (Array)	255	255
Max in Mean (Array)	2238	2953
SI-Peptid in Mean (Array)	916	999
Positionen	P₀ K₁(x ohne G, F, W, Y) L₂ P₃ F₄(x ohne W, Y) R₅	P₀ K₁(MPQRT) L₂ P₃ F₄(AKPR) R₅
Konsensus	PxLPxR	P%LP%R
Klasse	R2	R2
KD-Wert	75 µM	490 µM
Minimallänge	9 AS: PKLPFRSWG	9 AS: SLPKLPFRS

4.3 Regenerierung der CAPE-Membran

Für den Regenerierungsversuch wurde das Screeningarray gewählt, welches in der Bindungsstudie der SH3-Domäne von Abp1 benutzt wurde. Die große Anzahl der im Bindungsexperiment gefundenen positiven Spots stellte den Grund der Auswahl dar. Zunächst wurde die Membran mit den primären und sekundären Antikörper inkubiert. Die Kontrolldetektion (Abb. 23) entsprach der früher durchgeführten Bindungsstudien (Abb. 15). Auf dem Peptid-Array (Abb. 23) zeigten sich alle Markierungspeptide deutlichen. Ihr Minimum lag bei 1257 Mean, ihr Maximum bei 3312 Mean und ihr Mittelwert bei 2110 Mean.

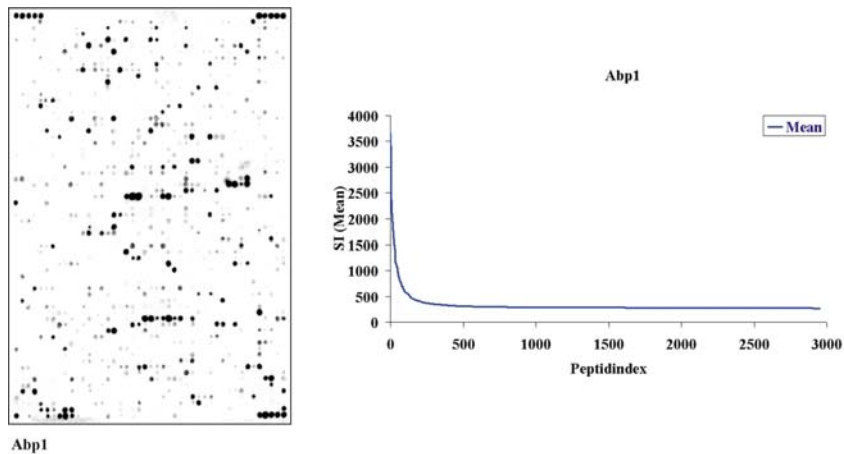


Abb. 23: Darstellung des Screeningarrays von Abp1-SH3 (CAPE-Membran) nach der Auswertung im Lumi-Imager und die graphische Darstellung aller Mean des Screeningarrays:

Linke Abbildung: Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Proteinbibliothek mit 2953 Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) mit einer Länge von 15 Aminosäure hergestellt. Die sichtbaren Spots (punktförmige Abbildungen) zeigen eine Interaktion mit der jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **blauer Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum

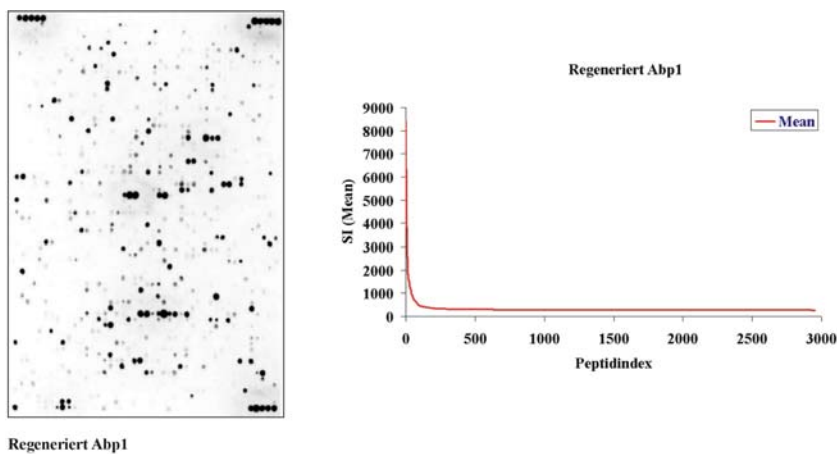


Abb. 24: Darstellung des Screeningarrays von Abp1-SH3 (CAPE-Membran) nach der Auswertung im Lumi-Imager und die graphische Darstellung aller Mean des Screeningarrays:

Linke Abbildung: Mit Hilfe der SPOT-Synthese wurde eine Proteinbibliothek mit 2953 Peptiden und 15 Markierungspeptiden (starkgefärbte Eckpunkte) mit einer Länge von 15 Aminosäure hergestellt. Die sichtbaren Spots (punktförmige Abbildungen) zeigen eine Interaktion mit der jeweiligen SH3-Domäne. **Rechte Abbildung:** Die Signalintensitäten (in Mean-Einheit Genspotter) wurden vom Maximum zum Minimum geordnet und gegen die Anzahl der nach Mean geordneten Peptide (Peptidindex) aufgetragen. **roter Graph:** Verlauf der Signalintensität vom Maximum zum Minimum

Anschließend wurde die Membran mit dem Regenerationspuffer behandelt und erneut mit dem Antikörperkit geprüft. Der rein visuelle Vergleich der Membranabbildungen vor und nach der Regenerierung (Abb. 24) zeigte, dass kaum eine Veränderung auf der Membran aufgetreten war. Die 15 Markierungspetide wurden deutlich dargestellt. Eine Auffälligkeit ergab sich zusätzlich in dem Vergleich der Graphen (Abb. 23 und Abb. 24). Die Auswertung der normalisierten Graphen vor (*blau*) und nach (*rot*) der Regenerierung kristallisierte in der (Abb. 25) heraus, dass sich die Zahl der erkannten Peptide reduzierte (*Fläche unter den blauen und roten Graphen*). Es zeigte sich, dass der maximale Mean-Wert der Membran um den Faktor 2,3 von 3660 Mean vor der Regeation auf 8412 Mean nach der Regeation stieg, während das Minimum bei ca. 270 Mean konstant blieb. Rein optisch erschien es, dass nach der Regenerierung eine bessere Auswertung möglich sei.

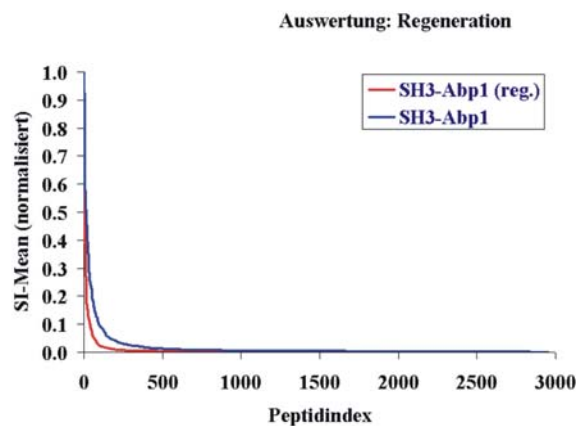


Abb. 25: **Signalintensitäten (Mean) der SH3-Abp1-Domänenarrays vor und nach der Regeneration:**

Vergleich der Signalintensitäten vor der Regenerierung (blauer Graph) und nach der Regenerierung (roter Graph). Die Mean-Werte wurden gegen den Peptidindex (siehe Abb.24) aufgetragen.

5 Diskussion

5.1 **Bewertung der WISE-Arrays**

Die erstellten Peptid-Arrays repräsentieren mit einer Anzahl von je 2953 Peptiden alle möglichen Bindungspartner aus dem Hefeproteom, welche mit dem vollständigen Satz der Hefe-SH3-Domänen interagieren könnten. Diese Anzahl ist mit einem Algorithmus der Forschergruppe Ceasareni aus der

Hefeprotein–datenbank ermittelt. Die Bewertung der Ergebnisse aus den Bindungsstudien zeigen, dass eine statistische Auswertung, der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse nur bedingt möglich ist. Eine für die Statistik notwendige Vergleichbarkeit der Membranen ist unter den gegebenen Voraussetzungen nicht möglich, da:

1. Die Regenerierung der CAPE-Membran nicht gelungen ist, so dass die Wiederholungen der Experimente in einem angemessenen Zeitraum unmöglich sind. Der Arbeitsaufwand pro Membran beträgt nämlich einen Monat.
2. Die Mean-Werte der Markierungspeptide auf den Membranen können auch nicht als einheitlicher Bezugswert extrapoliert werden, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Die Signalintensitäten der Markierungspeptide sind hierfür zu hoch. Die Mean-Werte liegen im Sättigungsbereich des Chemilumineszenzdetektors und damit außerhalb des linearen Messbereiches. Der lineare Messbereich auf dem sigmoiden Graphenverlauf definiert einen Bereich, in dem die geringste Fehlerabweichung der Signalintensitäten auftritt. Dieser Bereich entspricht einer Spotfärbung von grau nach schwarz.
3. Die Abweichungen in den Ergebnissen sind methodenbedingt. Die Beladungsdichte der Membranen variiert in einem Bereich von 16 bis 27 nmol/cm². Grund hierfür ist die nicht vollständige chemische Umsetzung der Edukte während der Reaktion.

Die SPOT-Synthese ist als semiquantitative Methode für das Durchmustern von Peptidbibliotheken gut geeignet, um eine Aussage über die Peptid–Domäneninteraktionen treffen zu können, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurden. Mit der semiquantitativen Auswertung aller Screeningarrays konnte eine Einteilung der SH3-Domänen von Myo5, Abp1, Yhr016 und Rvs167 nach ihrer Selektivität in bezug auf alle 2953 Liganden (Tab. 23-Tab. 26) über das Integral der jeweiligen Graphen und den Grenzwert (Tab. 22) erfolgen. Zum ersten Mal wurde eine große Anzahl von potentiellen Liganden der SH3–Domänen mit Hilfe der SPOT-Synthese auf einer Zellulosemembran erstellt. Als Grundlage diente die dafür eingeführte CAPE-Membran. Die Membran eignet sich besonders für die Untersuchung von Peptid-Domäneninteraktionen wegen der geringeren Beladungsdichte und den weniger stark auftretenden

Hintergrundsignalen.

Die Resultate der Auswertungen mit Hilfe der arbiträren Grenzwerte konnte über das Integral aus den graphischen Darstellungen bis auf den geringen Unterschied zwischen Yhr016-SH3 und Rvs167-SH3 verifiziert werden (Abb. 18, Tab. 22).

Der Vergleich der Ergebnisse nach der Grenzwertbestimmung und dem Integral in Bezug auf die Selektivität der Domänen zeigt einen Anstieg Myo5-SH3 zu Rvs167-SH3; nach der Grenzwertbestimmung: **Myo5-SH3 (12%) < Abp1-SH3 (5,4%) < Yhr016-SH3 (2,2%) < Rvs167-SH3 (1,7%)** und dem Integral: **Myo5-SH3 (0,068) < Abp1-SH3 (0,018) < Yhr016-SH3 (0,01) < Rvs167-SH3 (0,009)**. Es zeigt sich in den beiden Auswertverfahren, dass die SH3-Domäne von Myo5 von allen untersuchten Domänen die niedrigste Selektivität aufwies, gefolgt von der Domäne von Abp1. Beide Domänen zeigen eine geringe Selektivität im Vergleich zu den SH3-Domänen von Yhr und Rvs. Eine ähnliche Aussage kann nach der Auswertung der korrespondierenden Liganden von Abp1-/ Myo5-SH3 (24 Liganden) und Rvs167-/ Yhr016-SH3 (12 Liganden) bestätigen (Tab. 31). Eine Unterscheidung in der Selektivität zwischen Yhr-SH3 und Rvs167-SH3 an Hand des Integrals kann nicht erfolgen, da sich die Ergebnisse nur um 1/1000 unterscheiden. Da das Integral ein objektiver Wert im Vergleich zu dem arbiträren Grenzwert (*Bestimmung siehe 3.9*) darstellt und zusätzlich einen viel größeren Datenbereich einbezieht, werden die Domänen nach steigender Selektivität in Anlehnung an das Integral wie folgt geordnet: Myo5-SH3 < Abp1-SH3 < Yhr016-SH3 und Rvs167-SH3.

Die Voruntersuchung stellt einen wesentlichen Beitrag für die anzuschließenden Untersuchungen mit allen 27 Hefe-SH3-Domänen dar. Um eine semiquantitative Aussage zur Selektivität der SH3-Domänen über den Grenzwert (*GW*) erhalten zu können, müssen natürlich weitere Experimente erfolgen. Die Festlegung des Grenzwertes muss dann über eine Korrelation der Mean-Werte mit einer quantifizierbaren Größe erfolgen. Für die Definition eines Grenzwertes würde sich beispielsweise die Dissoziationskonstante (27) oder die Berechnung des GW der Mean-Werte auf CAPE-Membranen eignen. Über ein solches Verfahren ist über Antikörperbindungsstudien auf β -Alanin-Membranen berichtet worden (*A. Weiser persönliche Mitteilung, Arbeit eingereicht*).

Die vorliegenden Ergebnisse aus dem Screeningexperimenten lassen nur eine

Bewertung der Interaktion unter *in vitro* Bedingungen zu. Es werden Einschränkungen unter physiologischen Gegebenheiten nicht berücksichtigt wie z.B. die Lokalisation von Sequenzen im Protein, Veränderungen der Konzentrationen von Proteinen durch zeitlich und räumlich unterschiedliche Expressionen des sequenzzhaltenden Proteins, unterschiedliche Kompartimentisierung der Proteine in der Hefe sowie der Tatsache, dass die Liganden mehrfach in einem Protein auftreten können.

5.2 Bewertung der Peptid-Protein-Bindungen

Mit den Auswertungen der primären Screens kann kein gemeinsam bindender Ligand für die vier SH3-Domänen ermittelt werden (*Vergleich der positiven Binder* (Tab. 31) *nach der Grenzwertbestimmung*). Es wird daher je ein Ligand ausgewählt, der eine potentiell spezifische Bindung zwischen den SH3-Domänen Myo5 und Abp1 sowie Yhr016 und Rvs167 aufweisen kann. Die Auswahl der Liganden erfolgt zufällig an Hand möglichst hoher Signalintensitäten. Der Hintergrund dieser beiden Charakterisierungen ist es, ein Motiv im Liganden zu analysieren, das Rückschlüsse auf Aminosäuren erlaubt, die für eine Interaktion von Bedeutung sind.

Die Charakterisierungen der gefundenen Liganden ERPKRRAPPPVPKKP und VQQDSLPLPFPSWG erfolgt über Substitutionsanalyse, Längenanalyse, Einteilung in die jeweilige Klasse und die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (Tab. 22).

Unterschiede zwischen dem Ligand ERPKRRAPPPVPKKP von Myo5-SH3 und Abp1-SH3 zeigen sich in der Lage des Konsensusmotivs im Liganden, der Länge des Motivs, den flankierenden Aminosäuren des PxxP-Motivs und der Klassenzugehörigkeit (Tab. 22).

Die Auswertung der Interaktion zwischen dem Liganden und der SH3-Domäne von Myo5 zeigt, dass das sensitive Motiv mittig zwischen N- und C-Terminus liegt und eine Länge von 8 Aminosäuren aufweist. Die SH3-Domäne von Myo5 bevorzugt für die Interaktion mit ERPKR₋₄R₋₃A₋₂P₋₁P₀P₁V₂P₃KKP hydrophobe Aminosäuren in den Positionen -4, -3, -2 und 2 (Tab. 22) wie das Konsensusmotiv %%%PPx%P zeigt. R-4 kann nur durch hydrophobe Aminosäuren substituiert werden. Die hydrophoben Eigenschaften der langen aliphatischen Seitenkette von Arginin stehen an dieser Position im Vordergrund. R-3 zeigt in

dieser Position nicht die Funktion als spezifische Aminosäure (*positiver Ladungsträger*) für die Determinierung der Bindungsklasse (4). Es dominiert die hydrophobe Eigenschaft von Arginin, jedoch können hier wesentlich weniger hydrophobe Aminosäuren als Substituenten (*wie unter Position-4 aufgetreten*) eingesetzt werden (Tab. 22). Die Substitutionsanalyse des Liganden zeigt, dass R in der Position -3 nicht die ideale Besetzung ist (Abb. 19). Die Substituenten I, V, W zeigen eine stärkere Schwärzung ihrer Spots als die der wt-Aminosäure R. Die Position -2 kann ebenfalls nur durch hydrophobe Aminosäure ersetzt werden, allerdings auch nur durch eine geringere Anzahl wie unter Position -4. Die Position 2 ist spezifisch, da Valin nur durch die hydrophoben Aminosäuren I, L und P substituiert werden kann. Die Position 1 ist als unspezifisch zu bewerten, da P bis auf wenige Ausnahmen durch alle Aminosäuren ersetzt werden kann. Auffällig ist, dass keine aromatische Aminosäure für diese Position als Substitutionsanaloga dienen kann. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Bindungstasche der Domäne nicht für die Aufnahme von großen und hydrophoben Resten geeignet ist. Weiter zeigen die Positionen -1, 0 und 3, dass es sich hier um den Kern des Konsensusmotivs handelt. Der Kern wird durch die spezifischen P in diesen Positionen gebildet. Aus dem resultierenden Konsensusmotiv $\%_{-4}\%_{-3}\%_{-2}P_{-1}P_0X_1\%_2P_3$ kann keine eindeutige Zuordnung in eine Klasse nach Cesareni et al. (19) erfolgen. Der Ligand wird auf Grund der Auffälligkeit in der Position -3 (*enthält die aromatische Aminosäure W*) in bezug auf das bekannte $Px@_{-3}xxP_0xxP_3$ -Motiv tendenziell der Klasse 1@ zu geordnet (19), wobei die Präferenz für eine aromatische Aminosäure an der Position -3 nicht eindeutig bestätigt werden kann.

Das ermittelte $\%x\%P/Ax\#P(AGKR)\%[+]$ -Motiv aus der Interaktion von $ERPKRR_{-3}A_{-2}P_{-1}P_0P_1V_2P_3K_4K_5P$ und der SH3-Domäne von Abp1 ist zum C-Terminus verschoben (Tab. 22, Abb. 20). Das Konsensusmotiv ist mit 9 Aminosäuren länger als der Konsensus von der Ligand-Myo5-SH3-Interaktion. Das Konsensusmotiv lässt kein eindeutiges Kernmotiv ($PxxP$) aus der Substitutionsanalyse erkennen. Für die Nummerierung der einzelnen Positionen muss daher das ermittelte Motiv $\%x\%P/Ax\#P(AGKR)\%[+]$ mit dem bekannten $[+]xxxPxxPx[+]PxxL$ -Motiv (11) (16) (19) (25) verglichen werden. Die Positionen 0, 3 und 5 müssten nach dem allgemeinen $P_0xxP_3xK_5$ -Motiv den Kern des Konsensusmotivs bilden. Die Substitutionsanalyse (Abb. 20) zeigt,

dass P0 durch A ersetzt werden kann. Beide Aminosäuren zählen zu den kurzkettigen Varianten. Die Position 0 kann daher neben P durch eine weitere spezifische Aminosäuren A besetzt werden, da sie ähnliche Eigenschaften wie P aufweist. P3 kann sogar durch A, G, K und R ersetzt werden. Die Austauschaminosäuren A und G sind kurzkettig und polar, während K und R basisch positiv geladene Aminosäuren sind. Dieses Ergebnis ist in sofern erstaunlich, da die wt-Aminosäure P kurzkettig und hydrophob ist, daher eher den Eigenschaften von A und G entspricht. Die Aminosäuren K und R besitzen hingegen eine positive Ladung und eine lange hydrophobe Seitenkette. Es besteht somit die Möglichkeit, dass an dieser Position hydrophobe Kräften zwischen der Bindungstasche der Domäne und dem Liganden wirken können, und zusätzlich die weiter entfernte positive Ladung zur Bindung beitragen kann. K5 definiert die spezifische Position im Liganden (4). Diese Position kann nur durch die chemisch verwandte Aminosäure R ersetzt werden. Die Positionen -3, -1 und 4 können nur durch hydrophobe Aminosäuren substituiert werden. **R**₃ definiert nicht die spezifische Position im Motiv. Es dominiert an dieser Position die lange hydrophobe Seitenkette von R anstatt der positiv geladenen Guanidiumgruppe. Die Position -2 ist unspezifisch, da hier die überwiegende Anzahl der Aminosäuren als Substituenten dienen können. Die Position 2 kann nur durch aliphatische Aminosäuren substituiert werden. Der Ligand mit dem **%x%P/Ax#P(AGKR)%[+]**-Motiv wird von K5 in die Klasse K2 eingeteilt.

Trotz der Besonderheiten, die in der Interaktion zwischen dem Ligand ERPKRRAPPPVPPKP und den SH3-Domänen von Myo5 und Abp1 aufgetreten sind, ist die Peptid-Domänenbindung spezifisch. Die Affinität der Bindungen von 3,6 µM (*Myo5*) und 3,7 µM (*Abp1*) (Tab. 22) sind für SH3-Domänen sehr stark. Sie liegen im oberen Bereich von 1-100µM (15). Eine mögliche Erklärung für die hohe Affinität der beiden Interaktionen ist, dass aus dem großen Erkennungspool (Tab. 22) der beiden SH3-Domänen die Stärke der Bindungsaffinität einen wesentlichen Beitrag für die Spezifität der Peptid-Ligandinteraktion beiträgt. Die hoch affinen Liganden konkurrieren nicht mit den niedriger affinen Bindern.

Es zeigen sich geringfügige Unterschiede in Charakterisierung von VQQDSLP-KLPFRSWG und der SH3-Domänen von Yhr016 und Rvs167 in Bezug auf die Lage des Konsensusmotivs im Liganden, der Länge des Motivs, den

flankierenden Aminosäuren des PxxP-Motivs und der Klassenzugehörigkeit (Tab. 22).

In der Auswertung der Substitutionsanalysen des Liganden VQQDSL–**P₀K₁L₂P₃F₄R₅**SWG zeigte sich das Konsensusmotiv **P₀x₁L₂P₃x₄R₅** für die Interaktionen mit der SH3-Domäne von Yhr016 (Tab. 22, Abb. 22). Das Motiv liegt im Liganden zum C-Terminus verschoben und hat eine Länge von 6 Aminosäuren. Die Positionen x₁ und 4 sind unspezifische Orte im Konsensus, da sie durch die Mehrzahl der L-Aminosäuren substituiert werden können. Die Aminosäuren P, L, P und R der Positionen 0, 2, 3 und 5 definieren wichtige Bindungspartner für die Interaktion mit der Domäne. Diese Positionen sind in der Substitutionsanalyse nur durch sich selbst zu ersetzen. P₀ und P₄ sind die beiden Proline, die den Kern des Motivs bilden, und R₅ determiniert die Klasse des Liganden R2. Das analysierte PxLPxR-Motiv stimmt mit dem bekannten PxLPxR Motiv überein (19) (25). Damit kann bestätigt werden, dass Yhr016–SH3 den Liganden VQQDSL**P₀K₁L₂P₃F₄R₅**SWG der Klasse R2 mit dem allgemeinen PxxP-Motiv (4) bindet.

Die Interaktion zwischen der SH3-Domäne von Rvs167 und dem Liganden VQQDSL**P₀K₁L₂P₃F₄R₅**SWG ergibt in der Auswertung der Substitutionsanalyse das Konsensusmotiv **P₀%₁L₂P₃%₄R₅** (Tab. 22, Abb. 21). Das Motiv ist wie der Konsensus von Yhr016 zum C-Terminus verlagert. Es hat ebenfalls eine Länge von 6 Aminosäuren. Mit der näheren Betrachtung der Positionen 1 und 4 fällt auf, dass diese nicht ideal durch die wt-Aminosäuren im Liganden besetzt sind. Für K₁ zeigt sich in der Substitutionsanalyse eine stärkere Färbung der Spots für die hydrophoben Substituenten M, **P**, Q, R, und T. Die Position 4 ist durch F ebenfalls nicht ideal besetzt. Hier tritt eine intensivere Schwärzung durch den Austausch mit den hydrophoben Aminosäuren A, K, **P**, Q und K auf. Die Positionen 0, 2, 3 und 5 sind spezifische Positionen. Sie bilden die Kernpositionen des Konsensus mit den Aminosäuren P₀, L₂, P₃ und R₅.

Der Vergleich der Positionen in den Kosusmotiven P₀P₁#₂P₃P₄R₅ (*bekannt*^[(25)]) und **P₀%₁L₂P₃%₄R₅** (*ermittelt*) zeigt Unterschiede in den Präferenz für Position 1 und 4 für P bzw. hydrophobe Aminosäuren sowie in der Position 2 für aliphatische Aminosäuren bzw. die spezifische Aminosäure L. Da P zu den hydrophoben und L zu den aliphatischen und hydrophoben Aminosäuren zählt, unterscheiden sich die beiden Konsensusmotive unwesentlich. VQQDSL–

P₀K₁L₂P₃F₄R₅SWG ist in Bezug auf Rvs-SH3-Interaktion ein Klasse-2-Ligand, wobei, wie es aus der Literatur bekannt ist (16) (25), die SH3-Domäne von Rvs167 auch einen Klasse-1-Liganden mit dem Konsensus Rx#PxPP auf Grund der Pseudosymmetrie der PPII (Abb. 3) binden kann.

Die Affinitäten für die Ligandeninteraktion zwischen Yhr016- bzw. Rvs167-SH3 und VQQDSLPKLPFRSWG sind gering bzw. sehr schwach (Tab. 22). Der Wert liegt für Yhr016 bei 75µM (*gering*) und für Rvs167 bei 490µM (*sehr schwach*). Der Normbereich für die Bindungsstärker von SH3-Domänen liegt bei 1-100 µM (15). Die sehr schwache Affinität von 490µM (*schwache Bindung*) der Ligand-Rvs-SH3-Interaktion könnte implizieren, dass die Bindung nicht spezifisch ist. Diese Annahme bestätigt sich nicht. Die erkennbare positive Ligandenzahl von allen Domänen ist die geringste (Tab. 22), so muss die Spezifität auch nicht so hoch sein. Die Liganden können auch mit einer geringeren Affinität gebunden werden, weil es wenig Konkurrenz in diesem Pool gibt. Ähnliches gilt für die Affinität der SH3-Domäne von Yhr016 und ihrem Liganden. Die Affinität ist stärker mit 75µM, wobei geringfügig mehr Liganden als positive Binder (Tab. 22) ermittelt werden.

Bei den SH3-Domänen von Myo5 und Abp1 kann auf Grund des langen Konsensus und der erweiterten minimalen Bindungslänge davon ausgegangen werden, dass die flankierenden Aminosäuren am PxxP-Motiv einen größeren Einfluss nehmen als bei denen von Yhr- und Rvs-SH3. Ein direkter Beweis, dass flankierende Aminosäuren Einfluss auf die Bindungsspezifität ausüben, konnte jedoch nicht erfolgen. Dazu müssen Messungen für weitere KD-Werte mit kürzeren Liganden erfolgen sowie kombinatorische Bibliotheken synthetisiert und untersucht werden. Bei diesem Verfahren wird das Kernmotiv nicht verändert. Die flankierenden Aminosäuren werden wie in der Substitutionsanalyse ausgetauscht. Die genaueste Aussage in Bezug auf die Struktur und Funktion (*hier Interaktion zum Liganden*) kann z.B. die Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektrometrie erbringen. Damit können Aussagen über mögliche Aminosäurepräferenzen getroffen werden, die eine Folge der Struktur in der Bindungstasche der Domäne sind.

Weiter kann die Auswertung zu der Charakterisierung der Liganden zeigen, dass das bestehende Klassifizierungsmodell nach Cesareni et. al. (19) noch verbessert werden muss, damit die Liganden allgemeingültig in eine Bindungskategorie

zugeordnet werden können. So kann der Ligand der SH3-Domäne von Myo5 nicht eindeutig einer Klasse zugeordnet werden, während der Ligand der SH3-Domäne von Abp1 kein eindeutiges PxxP-Kernmotiv aufweist. Erstaunlicherweise trifft diese Beobachtung nicht für die Interaktion der SH3-Domäne von Yhr016 und Rvs167 zu. Es wurden eindeutige Konsusmotive und Klassen-zugehörigkeiten festgestellt. Die Konsensusmotive sind sehr ähnlich in ihrer Primärsequenz, Länge und Länge. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die selektiven SH3-Domänen (*Yhr016 und Rvs167*) einen eindeutigen und kurzen Konsensus im Liganden binden, während die promiskuitiven Domänen (*Myo5 und Abp1*) ein stärker variables und längeres Motiv im Liganden binden. Ähnliches zeigen die Größen der Minialepitope in den Längenanalysen von Myo5-SH3- und Abp1-SH3-Domäne mit 11 Aminosäuren bzw. von Yhr016- und Rvs167-SH3 mit 9 Aminosäuren.

Diese aufgetretenen Fragen werden Untersuchungsansätze für die nachfolgenden Experimente mit dem gesamten Satz der Hefe-SH3-Domänen sein.

Tab. 22: Gesamtzusammenfassung

	Myo-SH3	Abp1-Sh3	Yhr016-SH3	Rvs167-SH3
Array:				
Grenzwert in Mean	404	449	438	446
Binderzahl	354	159	65	51
Übereinstimmungen	24	24	-	-
	-	-	12	12
Selektivität in %	12	5,4	2,2	1,7
Integral	0,068	0,018	0,01	0,009
Charakterisierung:	ERPKRR...	ERPKRR...	VQQDSL...	VQQDSL...
Min in Mean (Array)	271	267	255	255
Max in Mean (Array)	1150	3660	2238	2953
SI-Peptid in Mean (Array)	916	999	916	999
Positionen	R ₋₄ (HIKLMVW)	R ₋₄ (x ohne G,N,P,Y)		
	R ₋₃ (IVW)	R ₋₃ (AFGHIKTW)		
	A ₋₂ (KLMPN)	A ₋₂ (x ohne P)		
	P ₋₁	P ₋₁ (GSAFHIKLMV)		
	P ₀	P ₀ /A	P ₀	P ₀
	P ₁ (x ohne F,T,V,W,Y)	P ₁ (x ohne G,N,Q,S,T,W,Y)	K ₁ (x ohne G,F,W,Y)	K ₁ (MP QRT)
	V ₂ (ILP)	V ₂ (IKL)	L ₂	L ₂
	P ₃	P ₃ (AGKR)	P ₃	P ₃
		K ₄ (DQSTAPRV)	F ₄ (x ohne W,Y)	F ₄ (AKPR)
		K ₅ /R	R ₅	R ₅
Konsensus	%%PPx%P	%x%P/Ax#P/GKR	PxLPxR	P%LP%R
		%[+]		
Klasse	tendenziell @1	K2	R2	R2
KD-Wert	3,6 µM	3,7 µM	75 µM	490 µM

	Myo-SH3	Abp1-Sh3	Yhr016-SH3	Rvs167-SH3
Minimallänge	11 AS: PKRRAPPPVPK	11 AS: RRAPPPVPKKP	9 AS: PKLPFRSWG	9 AS: SLPKLPFRS

5.3 Regenerierung

Eine Regenerierung mit dem Zitratpuffer ist nicht möglich. Wahrscheinlich bindet das GST-Markerprotein an der Zellulose, da direkt markierte Proteine wie die WW-Domänen von der Membran abgelöst werden können (49). Andere Regenerierungsversuche mit unterschiedlichen Pufferlösungen (Tab. 32) zeigten ebenfalls keine Erfolge (*C. Landgraf, R. Volkmer persönliche Mitteilungen*).

6 Ausblick

Die Anwendung der Erkenntnisse über das Bindungsverhalten der SH3-Domänen könnte die therapeutische Unterbrechung der Interaktion zwischen Domäne und Ligand sein. So schalten z.B. pathogene Viren den Apoptosemechanismus von humanen Zellen aus, indem ihre virenspezifischen Proteine an die SH3-Domäne der p58 Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase (*PI3K*) binden. Infolgedessen wird der Second Messengers Phosphoinositoltriphosphat gebildet, der unter anderen eine Serin- Threoninkinase (*Akt*) aktiviert. Diese Kinase hat eine kontrollierende Funktion in der Apoptose. Das Hepatitis-C-Virus nutzt diesen Signaltransduktionsweg über sein NS5A-Protein, um die Apoptose zu umgehen, dadurch kann sich der Virus in der betroffenen Zelle replizieren, ohne dass die infizierte Zelle vom Immunsystem zerstört wird. NS5A ist ein Serinphosphoprotein, dessen Funktion nicht geklärt ist. Es wird vermutet, dass die ständige Aktivierung der PI3K über NS5A zu chronischer Leberzirrhose und später zum hepatozellulären Karzinom führen kann. Es wird nach einem Wirkstoff gesucht, der die Interaktion zwischen NS5A und der SH3-Domäne von p58 unterbricht (50) (51).

Ein anderer Ansatz für die Suche nach einem Wirkstoff ist z.B die Veränderung von Proteinen, die dann auf Grund ihrer Modifikation mit dem pathogenen Molekül reagieren, aber nicht mit physiologischen Zellbestandteilen. Ein solcher Therapieansatz wird durch die Mutation des RT-Loops in der SH3-Domäne verfolgt. Dadurch wurde die Affinität einer humanen SH3-Domäne zu dem Nef-Protein des Human Immunodeficiency Virus 1 (*HIV1*) stark erhöht. Jetzt zielt man auf einen möglichen Wirkstoff ab, der eventuell ein Therapeutikum für die

Behandlung von HIV-positiven Menschen sein könnte. Das Nef-Protein erniedrigt die Konzentration des Major Histokompatibilitäts Faktor 1 (MHC) und des CD4-Rezeptors. Damit kann das HIV die Wirtsabwehr umgehen und in der Zelle persistieren (52) (53).

Das Bestreben, eine Technologie stetig zu verbessern, zeigt sich unter anderem in der Einführung eines derivatisierten Glasträgers für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen biologischen Verbindungen (54) (55).

Dazu werden mit Hilfe der SPOT-Synthese und der Fmoc-Strategie Spots auf einer derivatisierten Zellulosemembran erstellt. Die Schutzgruppen der Peptide werden abgespaltet. Danach werden die gesamten Peptide von der Membran gelöst und in einem Puffersystem (*phosphatgepuffertes Salin mit 40 % Glycerol*) in Mikrotiterplatten gelöst (54). Die Lösung dient als Reservoir für den Umschichtungsvorgang auf den Glasträger. Hierbei wird analog zur SPOT-Synthese die molekulare Bibliothek synthetisiert. So kann eine hohe Anzahl von Trägern entstehen, die alle mit demselben Peptidsatz bestückt sind. Das Bindungsmolekül ist ein aldehydgruppenhaltiges Silan. Über eine Schiffsbasis werden die Proteine bzw. Peptide an die Glasoberfläche gekoppelt (54). Mit dieser Methode können zurzeit keine Peptide Schritt für Schritt aus Aminosäuren synthetisiert werden. Es muss bisher immer wieder auf den aufwendigen Übertragungsschritt der Peptide zurückgegriffen werden. Die Konzentration der pro Spot gebundenen Peptide ist manchmal zu gering, so dass es zu Ungenauigkeiten in der Auswertung kommen kann. Die Peptidedichte ist auf dem Träger hingegen sehr hoch (1600 Spots/cm^2) (54).

Anhang

Datensammlung

Die Tabellen mit der Auswertung der Screeningarrays von den vier verwendeten SH3-Domänen und der Regenerierungen zeigen aufgrund der großen Datenmenge von jeweils 2953 Messwerten nur die ersten 20 Werte. Alle Werte in den Tabellen sind geordnet nach den Mean-Werten. Die Erklärung für den Tabellenkopf lautet Peptid-Positionsnummer im Array (*ohne Kontrollpeptide*), Peptidnummer- nach Mean geordnetes Peptid, Mean- SI-Einheit von Genspotter, Fmean- normalisierte Mean-Werte, min- Minimum und max- Maximum der gesamten Messwerte.

Abp1-SH3

Tab. 23: Datensatz Abp1-SH3

Peptid	Peptidnummer	Sequenz	Mean	Fmean	min	max
1325	1	KRRAPPPVPKKPSSR	3660	1.000	267	3660
1326	2	PKRRAPPPVPKKPSS	3544	0.966		
2934	3	KTQOKPAIPQKKSF	3284	0.889		
1331	4	RAPPPVPKKPSSRIA	2822	0.753		
1252	5	RPPRPPKPLHLRTE	2695	0.716		
2231	6	KDKKTKPTPPKPSH	2505	0.660		
2201	7	FPPKRKPLLRPQRSD	2240	0.581		
2227	8	DKKTKPTPPKPSHL	2229	0.578		
1254	9	KDKSRPPRPPKPLH	2106	0.542		
2698	10	STKKPRPPVKSKPKH	2105	0.542		
2228	11	TKPTPPKPSHLKPK	2087	0.537		
1330	12	RPKRRAPPPVPKKPS	2000	0.511		
885	13	KNRKNLPTIPIRLSG	1981	0.505		
2312	14	GSKSGPPRPPKPKST	1976	0.504		
193	15	LKPPIGRPPKFPKSP	1913	0.485		
1251	16	DKSRPPRPPKPLHL	1867	0.472		
151	17	KKAPPPVVKPKPRNF	1841	0.464		
1729	18	NMLKKKPLKKPLKRF	1793	0.450		
1547	19	LKHGWKPLRPIKLIS	1742	0.435		
2933	20	AAHKTGPSIPPKKVE	1650	0.408		

Myo5-SH3

Tab. 24: Datensatz Myo5-SH3

Peptid	Peptidnummer	Sequenz	Mean	Fmean	min	max
714	1	PALPSLPPPPLLNV	1150	1.000	271	1150
322	2	APKHAPPPVPNETDN	1119	0.964		
1103	4	IPSRPAPKPPSSASA	1080	0.920		
640	5	APNRIPPKVPVINDN	1029	0.862		

Peptid	Peptidnummer	Sequenz	Mean	Fmean	min	max
888	6	AKDLIVRRPEWNEG	1001	0.830		
42	7	SEMSNSPQIPKKVK	933	0.753		
1102	8	ANGKFIPSRPAKPP	930	0.750		
2358	9	VFQFMPTTPISTKM	898	0.713		
12	10	AVDKIMPPTPAKKVE	896	0.711		
545	11	KRPDMPPPSIIPRKN	893	0.707		
929	12	IRMPSNPALPKLLN	861	0.671		
1292	13	PPSWKPPDLPIRLRK	846	0.654		
779	14	KRMKALPKGPAALIN	835	0.642		
1105	15	GKFIPSRPAKPPSS	804	0.607		
731	16	FKTREFMSLPQALET	795	0.597		
411	17	RMKIMMSMEPKKPII	783	0.583		
1100	18	KFIPSRPAKPPSSA	783	0.583		
44	19	ADLPLDLPPEPTE	755	0.551		
598	20	LTLLKMPEVPNSVSP	753	0.549		

Rvs167-SH3

Tab. 25: Datensatz Rvs167-SH3

Peptid	Peptidnummer	Sequence	Mean	Fmean	min	max
920	1	AATTSTPPLRRRAT	2238	1.000	255	2238
1114	2	PLQSKIPMLPSRRTM	2022	0.891		
2171	3	SSSSTPPTLPPRIE	1301	0.528		
153	4	APERAVPILPPRNV	1145	0.449		
2169	5	LKRITSPPLPPRADS	1067	0.410		
888	6	AKDLIVRRPEWNEG	1062	0.407		
2170	7	QAPLDRPQLPPRQVV	1008	0.380		
1351	8	KNWKLPPRLPHRAAQ	981	0.366		
1719	9	ANNQGPPNLPARDKS	951	0.351		
2865	10	GATNNAPTLPKRKNP	894	0.322		
2276	11	AKRVAPPPLPNRQLP	854	0.302		
1292	13	PPSWKPPDLPIRLRK	706	0.227		
214	14	LPMNIQPDLPKRKIM	694	0.221		
312	15	RSSAAPPPPPRRATP	649	0.199		
311	16	SRSSAAPPPPPRRAT	618	0.183		
2602	17	QQNRPLPOLPNRNNR	617	0.182		
378	18	ATKSASPTLPTRRSR	603	0.175		
1239	19	AERNYAPRLPRRETS	586	0.167		
2520	20	DDEDVPPQLPTRTKS	563	0.155		

Yhr016-SH3

Tab. 26: Datensatz Yhr016-SH3

Peptid	Peptidnummer	Sequence	Mean	Fmean	min	max
2928	1	SSSSPPPLPTRRDH	2953	1.000	255	2953
2520	2	DDEDVPPQLPTRTKS	2595	0.867		
2518	3	EEEEHPPLPARRKS	2439	0.809		
2247	4	ISNFVPPNLPMRRFK	1814	0.578		
2828	5	VATSTSPKLPPRGKQ	1613	0.503		
2858	6	VQPTAAPATPPRHIS	1586	0.493		
2169	7	LKRITSPPLPPRADS	1580	0.491		
1808	8	ITNRGPPPLPPRANV	1454	0.444		
2865	9	GATNNAPTLPKRKNP	1428	0.435		
2815	10	NPLKEPRLPKRKVA	1117	0.319		
1114	11	PLQSKIPMLPSRRTM	1080	0.306		
2602	12	QQNRPLQQLPNNNR	1077	0.305		
2171	13	SSSTPPTLPPRIIE	1068	0.301		
1239	14	AERNYAPRLPPRETS	1000	0.276		
1719	15	ANNQGPPNLPARDKS	945	0.256		
173	16	VQQDSLKLPFRSWG	916	0.245		
2929	17	DGNEEKPLLTPRPNK	890	0.235		
310	18	EAEAAAPQLPSRSSA	855	0.222		
2170	19	QAPLDRPOLPPRQVV	789	0.198		
2096	20	SNNSPLVLPRIIST	786	0.197		

Regenerierung Abp1-SH3

Tab. 27: Datensatz Regenerierung Abp1-SH3

Peptid	Peptidnummer	Sequence	Mean	min	max	Fmean
2231	1	KDKKTKPTPPPKPSH	8412	270	8412	1.000
1326	2	PKRRAPPPVKKPKSS	6665			0.785
888	3	AKDLIVRRPEWNEG	6012			0.705
1325	4	KRRAPPPVKKPKSSR	5705			0.668
1331	6	RAPPPVKKPKSSRIA	4014			0.460
2228	7	TKPTPPPKPSHLKPK	3643			0.414
2105	8	MTNLRKPSAPKRMSS	3227			0.363
2934	9	KTKQOKPAIPQKKSF	2620			0.289
2698	10	STKKPRPPVKSKPKH	2606			0.287
1252	11	RPPRPPPKPLHLRTE	2512			0.275
2312	12	GSKSGPPPRPKPST	2469			0.270
1330	13	RPKRRAPPPVKKPKS	2467			0.270
2201	14	FPPKRKPLLRQRS	2019			0.215
2587	15	RRGPAPPPPHRHVT	1921			0.203
885	16	KNRKNLPTIPIRLSG	1750			0.182
466	17	RPSWLPSKPNSEHF	1682			0.173
1251	18	DKSRPPRPPKPLHL	1665			0.171
1294	19	SSSRKPPIPAKQHV	1620			0.166
2047	20	RMHSRPLVATMLKHW	1587			0.162

Tab. 28: Datensammlung Markierungspeptide von SH3-Domänen Abp1, Myo5, Rvs167, Yhr016

Spot	Sequence/Abp1	Mean	Spot	Sequence/Myo5	Mean	Spot	Sequence/Rvs	Mean	Spot	Sequence/Yhr	Mean
1	LASDLIVPRR	1756	1	LASDLIVPRR	2367	1	LASDLIVPRR	1118	1	LASDLIVPRR	1203
2	LASDLIVPRR	1873	2	LASDLIVPRR	1997	2	LASDLIVPRR	1651	2	LASDLIVPRR	686
3	LASDLIVPRR	1446	3	LASDLIVPRR	2014	3	LASDLIVPRR	1500	3	LASDLIVPRR	1402
4	LASDLIVPRR	1369	4	LASDLIVPRR	2506	4	LASDLIVPRR	1589	4	LASDLIVPRR	2067
5	LASDLIVPRR	1259	5	LASDLIVPRR	2533	5	LASDLIVPRR	1557	5	LASDLIVPRR	972
41	LASDLIVPRR	2710	41	LASDLIVPRR	2374	41	LASDLIVPRR	2907	41	LASDLIVPRR	1786
42	LASDLIVPRR	1857	42	LASDLIVPRR	3691	42	LASDLIVPRR	3336	42	LASDLIVPRR	3276
43	LASDLIVPRR	2017	43	LASDLIVPRR	3210	43	LASDLIVPRR	3762	43	LASDLIVPRR	3262
44	LASDLIVPRR	2146	44	LASDLIVPRR	3662	44	LASDLIVPRR	4184	44	LASDLIVPRR	3277
45	LASDLIVPRR	2243	45	LASDLIVPRR	3738	45	LASDLIVPRR	4339	45	LASDLIVPRR	2856
3011	LASDLIVPRR	2134	3011	LASDLIVPRR	1664	3011	LASDLIVPRR	1794	3011	LASDLIVPRR	3107
3012	LASDLIVPRR	3312	3012	LASDLIVPRR	1559	3012	LASDLIVPRR	2010	3012	LASDLIVPRR	1863
3013	LASDLIVPRR	2499	3013	LASDLIVPRR	1481	3013	LASDLIVPRR	2159	3013	LASDLIVPRR	2244
3014	LASDLIVPRR	2489	3014	LASDLIVPRR	1592	3014	LASDLIVPRR	2569	3014	LASDLIVPRR	2353
3015	LASDLIVPRR	2545	3015	LASDLIVPRR	1914	3015	LASDLIVPRR	2078	3015	LASDLIVPRR	2284
	min	1259		min	1481		min	1118		min	686
	max	3312		max	3738		max	4339		max	3277
	MW	2110		MW	2420		MW	2437		MW.	2176

Tab. 29: Längenanalyse: Ligand: ERPKRRAPPPVPPKKP Myo5-SH3/ Abp1-SH3

Spot 1-21	Spot 22-36	Spot 37-55	Spot 56-60
ERPKRRAPPPVPPKKP ERPKRRAPPPVPPKK RPKRRAPPPVPPKKP ERPKRRAPPPVPPK RPKRRAPPPVPPKK PKRRAPPPVPPKKP ERPKRRAPPPVP RPKRRAPPPVPK PKRRAPPPVPPKK ERPKRRAPPPVP RPKRRAPPPVPK PKRRAPPPVPPKK KRRAPPPVPPKKP ERPKRRAPPPV RPKRRAPPPVP PKRRAPPPVPPKK KRRAPPPVPPKK RRAPPPVPPKKP ERPKRRAPPP RPKRRAPPPV PKRRAPPPVP KRRAPPPVPK RRAPPPVPPKK RAPPVPKKP	ERPKRRAP RPKRRAPPP PKRRAPPPV KRRAPPPVP RRAPPPVPK RAPPVPKK APPPVPKKP ERPKRRAP RPKRRAP PKRRAPPP KRRAPPPV RRAPPPVP RAPPVPK APPPVPKK PPVPKKP	ERPKRR RPKRRAP PKRRAP KRRAPPP RRAPPPV RAPPVP APPPVPK PPVPKK PPVPKKP ERPKRR RPKRR PKRRAP KRRAP RRAPPP RAPPVP APPPVP PPVPK PPVPKK PVPKKP	ERPKR RPKRR PKRR KRRAP RRAP ABP1: RRAPPPVPPKKP Myo5: PKRRAPPPVPK

Tab. 30: Längenanalyse: Ligand: VQQDSLPLPKLPFRSWG Rvs167-SH3/ Yhr016-SH3

Spot 1-21	Spot 22-36	Spot 37-55	Spot 56-66
VQQDSLPLPKLPFRSWG VQQDSLPLPKLPFRSWG QQDSLPLPKLPFRSWG VQQDSLPLPKLPFRS QQDSLPLPKLPFRSW QQDSLPLPKLPFRSWG VQQDSLPLPKLPFR QQDSLPLPKLPFRS QDSLPLPKLPFRSW DSLPLPKLPFRSWG VQQDSLPLPKLP QQDSLPLPKLPFR QDSLPLPKLPFRS DSLPLPKLPFRSW SLPKLPFRSWG VQQDSLPLPKLP QQDSLPLPKLP QDSLPLPKLPFR DSLPLPKLPFRS SLPKLPFRSW LPKLFRSWG	VQQDSLPLK QQDSLPLKLP QDSLPLKLPF DSLPLKLPFR SLPKLPFRS LPKLFRSWG PKLPFRSWG VQQDSLPLK QQDSLPLKLP QDSLPLKLP DSLPLKLPF SLPKLPFR LPKLFRS PKLPFRSW KLFRSWG	VQQDSLPL QQDSLPLK QDSLPLKLP DSLPLKLP SLPKLPF LPKLFRS PKLPFRS KLFRSWG LPFRSWG VQQDSL QQDSLPL QDSLPLK DSLPLKLP SLPKLP LPKLFP PKLPFR KLFRS LPFRSW FRSWG	VQQDSL QQDSL QDSLPL DSLPLK SLPKLP LPKLFP PKLPFR KLFRS LPFRS FRSWG RVS167:SLPKLPFRS YHR016: PKLPFRSC

Tab. 31: Korrespondierende Liganden von Abp1-/ Myo5-SH3 und Rvs167-/ Yhr016-SH3

Sequence	Mean-Abp1	Mean-Myo5	Sequence	Mean-Rvs167	Mean-Yhr016
LKPPIGRPKFPKSP	1913	736	APERAVPILPPRNNV	1145	459
FSKMAKKLLPYKPHN	768	583	VQQDSLPLPKLPFRSWG	999	916
KMSRSPRPPLSLKII	778	559	LPMNIQPDLPKRKIM	694	657
TSKMLKPPKQRRPHS	642	700	ATKSASPTLPTRRSR	603	529
SKIRPTPRKPSRMAT	1456	520	PKFLNSPDLPERTKL	432	581
AKDLIVRRPEWNEG	1508	1001	AERNYAPRLPRRETS	586	1000
KFIPSRPAPKPPSSA	807	783	DPNFLPLNLPMTFRK	407	507
GKFIPSRPAPKPPSS	736	804	PPSWKPPDLPIRLRK	706	553
ISRRRLPVIMHRLKM	505	461	STPTSGPPLPPRNT	520	467
DKSRPPRPPLKPLHL	1867	464	SSSTPPTLPPRRIE	1301	1068
ERPKRRAPPVPKKP	1594	676	DDEDVPPQLPTRTKS	563	2595
PKRRAPPVPKKPSS	3544	615	SSSSPPPLPTRRDH	401	2953
RPKRRAPPVPKKPS	2000	410			
SDKKKRPPILMLHGL	471	411			
NMLKKKPLKKPLKRF	1793	425			
VMNRRKIAMPKRRMA	464	422			
MTNLRKPSAPKRMSS	693	501			
VRTRRPPPPPIPIST	694	412			
RRRPPPPPIPISTQKP	555	501			
RRGPAPPPPHRHVT	893	412			
GVRLPAPPPPPRRGP	1043	434			
NTMKKRPAPPSLPSL	633	448			
RMVRRRPLRVQFSAR	587	492			
LKPRKRMILPAWIKD	561	490			

Tab. 32: Puffer für die Regenerierung

Puffersystem	Chemikalien	Menge	Anwendung des Puffers
1.SDS	Tris	62,5 mM	30 min bei 50°C schütteln
	SDS	2%	3x10 min mit TBS waschen
	Mercaptoethanol	100 mM	
	HCl	37% für pH6	
2.SDS	siehe 1.	siehe 1.	siehe 1.
PBS 10 fach	NA2HPO4*12H2O	33g/l	3x20 min
	NAH2PO4*12H2O	2,2g/l	
	NaCl	87,7g/l	
	HCl	37 % für pH8	

Puffersystem	Chemikalien	Menge	Anwendung des Puffers
TBS	NaCl	80g/l	3x20 min
	KCl	2g/l	
	Tris	61 g/l	
	HCl	37 % für pH8	
TBS 1 fach	TBS 10 fach	1:10	1x10 min
3.T-TBS	TBS 10 fach	1:10	
	Tween 20	0.05%	
4. Tris pH 8,5	Tris-HCl	0,1M	1 mal
	NaCl	2M	
Acetat pH 4,5	NaAc	0,1	1 mal
	NaCl	2M	
			3 mal wiederholen
5.Harnstoff	Harnstoff/Diethylamin	6M	10 min bei 50°C schütteln
	Thioharnstoff	2M	3x10 min mit TBS waschen
	SDS	1%	
TBS 10 fach	NaCl	80 g/l	
	KCl	2g/l	
	Tris	61 g/l	
	HCl	37 % für pH8	

Literaturverzeichnis

- (1) Pawson T., Scott J.D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins *Science* 1997;278:2075-2080
- (2) Pawson T. Protein modules and signalling networks *Nature* 1995;373:573-580
- (3) Zarrinpar A., Bhattacharyya R.P., Lim W.A. The structure and function of proline recognition domains *Science* 2003;301:1791-10
- (4) Mayer B.J. SH3 domains: complexity in moderation *Journal of Cell Science* 2001;114:1253-1263
- (5) Liu M., Grigoriev A. Protein domains correlate strongly with exon in multiple eukaryotic genomes- evidence of exon shuffling? *Trends Genet.* 2004;20:399-403
- (6) Mayer B.J., Hamaguchi M., Hanafusa H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C *Nature* 1988;332:272-275
- (7) 08-2004 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=stryer.section.2108>
- (8) Lila T., Drubin D.G. Evidence for physical and functional interactions among two *Saccharomyces cerevisiae* SH3-domain proteins, an adenylate cyclase-associated protein and the actin cytoskeleton *Molecular Biology of the Cell* 1997;8:367-385
- (9) Tang H.Y., Xu J., Cai M. Pan1p, End3p, and Sla1p, three yeast proteins required for normal cortical actin cytoskeleton organization, associate with each other and play essential roles in cell wall morphogenesis *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:12-20
- (10) Warren D.T., Andrews P.D., Gourlay C.W., Ayscough K.R. Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics *J. Cell. Sci.* 2002;115:1703-1715
- (11) Fazi B., Cope M.J., Douangamath A., Ferracuti S., Schirwitz K., Zucconi A., Drubin D.G., Wilmanns M., Cesareni G., Castagnoli L. Unusual binding properties of the SH3 domain of the yeast actin-binding protein Abp1: structural and functional analysis *Journal of Biological Chemistry* 2001;275:5290-5298
- (12) MacArthur M.W., Thornton J.M. Influence of proline residues on protein conformation *J. Mol. Biol.* 1991;218:397-412
- (13) Williamson M.P. The structure and function of proline-rich regions in proteins *Biochem. J.* 1994;297:249-260
- (14) Creamer T.P. Left-handed polyproline II helix formation is (very) locally driven *Proteins* 1998;33:218-226
- (15) Kay B.K., Williamson W.P., Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains *FASEB J.* 2000;14:231-241
- (16) Landgraf C., Panni S., Montecchi-Palazzi L., Castagnoli L., Schneider-Mergener J., Volkmer-Engert R., Cesareni G. Protein interaction networks by proteome peptide scanning *PLoS Biol* 2004;2:94-103
- (17) Feng S., Chen J.K., Simon J.A., Schreiber S.L. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of general model for SH3-ligand interactions *Science* 1994;266:1241-1247
- (18) Lim W.A., Richards F.M., Fox R.O. Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains *Nature* 1994;372:375-379
- (19) Cesareni G., Panni S., Nardelli G., Castagnoli L. Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains? *FEBS* 2002;251:338-44
- (20) Zhao Z.S., Manser E., Lim L. Interaction between PAK and Nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:3906-3917

- (21) Zarrinpar A., Bhattacharyya R.P., Nittler M.P., Lim W.A. Sho1 and Pbs2 Act as Coscaffolds Linking Components in the Yeast High Osmolarity MAP Kinase Pathway *Mol Cell* 2004 6825-832
- (22) Hiipakka M., Poikonen K., Saksela K. SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificity targeted to HIV-1 Nef *J. Mol. Biol.* 1999 293 1097-1106
- (23) Schwikowski B., Uetz P., Fields S. A network of protein-protein interactions in yeast *Nat Biotechnol* 2000 18 1257-1261
- (24) Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes *Nature* 2002 415 141-147
- (25) Tong A.H., Drees B., Nardelli G., Bader G.D., Brannetti B., Castagnoli L., Evangelista M., Ferracuti S., Nelson B., Paoluzi S., Quondam M., Zucconi A., Hogue C.W., Fields S., Boone C., Cesareni G. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules *Science* 2002 295 321-324
- (26) Pawson T. Organization of cell-regulatory systems through modular-protein-interaction domains. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 2003 361 1251-1262
- (27) Castagnoli L., Costantini A., Dall'Armi C., Gonfloni S., Montecchi-Palazzi L., Panni S., Paoluzi S., Santonico S., Cesareni G. Selectivity and promiscuity in the interaction network mediated by protein recognition modules *FEBS* 2004 567 74-79
- (28) Panni S., Dente L., Cesareni G. In vitro evolution of recognition specificity mediated by SH3 domains reveals target recognition rules *The Journal of Biological Chemistry* 2002 277 21666-21674
- (29) Evangelista M., Klebl B.M., Tong A.H., Webb B.A., Leeuw T., Leberer E., Whiteway M., Thomas D.Y., Boone C. A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex *Journal of Cell Biology* 2000 148 353-362
- (29) Frank R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications *J Immunol Methods* 2002 267 13-26
- (30) Kramer A., Reineke U., Dong L., Hoffmann B., Hoffmuller U., Winkler D., Volkmer-Engert R., Schneider-Mergener J. Spot synthesis: observations and optimizations *J Pept Res* 1999 54 319-327
- (31) Reineke U., Volkmer-Engert R., Schneider-Mergener J. Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology *Curr Opin Biotechnol* 2001 12 59-64
- (32) Wenschuh H., Volkmer-Engert R., Schmidt M., Schulz M., Schneider-Mergener J., Reineke U. Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides *Biopolymers* 2000 55 188-206
- (33) 08-2004 http://www.malteser-gp/MHDTRME_Malaria.html#Prophylaxe
- (34) 08-2004 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
- (35) 08-2004 http://dcc2.bumc.bu.edu/richardl/world_TB_Day/TB_Drug_Issues/tuberculosis_drug_issues.htm
- (36) 08-2004 <http://www.who.int/gtb/publications/gmdrt/>
- (37) Ravi Chandra B., Gowthaman R., Raj Akhouri R., Gupta D., Sharma A. Distribution of proline-rich (PxxP) motifs in distinct proteomes: functional and therapeutic implications for malaria and tuberculosis *Protein Eng Des Sel* 2004 17 175-182

- (38) David C., McPherson P.S., Mundigl O., de Camilli P. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 93:331-335
- (39) Schröder M., Pongratz D. Paraneoplastische Erkrankungen des Zentralnervensystems aus neurologischer und internistischer Sicht *Internist* 2001 79:99-1010
- (40) Floyd S., Butler M.H., Cremona O., David C., Freyberg Z., Zhang X., Solimena M., Tokunaga A., Ishizu H., Tsutsui K., De Camilli P. Expression of amphiphysin I, an autoantigen of paraneoplastic neurological syndromes, in breast cancer *Mol Med* 1998 4:29-39
- (41) Prendergast G.C. Mechanisms of apoptosis by c-Myc *Oncogene* 1999 18:2967-2987
- (42) DuHadaway J.B., Sakamuro D., Ewert D.L., Prendergast G.C. Bin1 mediates apoptosis by c-Myc in transformed primary cells *Cancer Res* 2001 61:3151-3156
- (43) Ge K., DuHadaway J., Sakamuro D., Wechsler-Reya R., Reynolds C., Prendergast G.C. Losses of the tumor suppressor BIN1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity *Int J Cancer* 2000 85:376-383
- (44) Kramer A., Schneider-Mergener J. Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports *Methods Mol Biol* 1998 87:25-39
- (45) 08-2004 <http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001/abstracts/vortraege/steiner.pdf>
- (46) 08-2004 <http://www.fgcz.ethz.ch/technology/biacore.basics.pdf>
- (47) 08-2004 http://bieson.ub.uni-bielefeld.de/volltexte/2004/573/pdf/Dissertation_DBaechle.pdf
- (48) Aasland R., Abrams C., Ampe C., Ball L.J., Bedford M.T., Cesareni G., Gimona M., Hurley J.H., Jarchau T., Lehto V.P., Lemmon M.A., Linding R., Mayer B.J., Nagai M., Sudol M., Walter U., Winder S.J. Normalization of nomenclature for peptide motifs as ligands of modular protein domains *FEBS Lett* 2002 513:141-144
- (49) Otte L., Wiedemann U., Schlegel B., Pires J.R., Beyermann M., Schmieder P., Krause G., Volkmer-Engert R., Schneider-Mergener J., Oschkinat H. WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains *Protein Sci* 2003 12:491-500
- (50) Street A., Macdonald A., Crowder K., Harris M. The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade *J Biol Chem* 2004 279:12232-12241
- (51) Waris G., Siddiqui A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C *J Biosci* 2003 28:311-321
- (52) Hiipakka M., Huotari P., Manninen A., Renkema G.H., Saksela K. Inhibition of cellular functions of HIV-1 Nef by artificial SH3 domains *Virology* 2001 289:152-159
- (53) Roeth J.F., Williams M., Kasper M.R., Filzen T.M., Collins K.L. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail *J Cell Biol* 2004 167:903-913
- (54) MacBeath G., Schreiber S.L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination *Science* 2000 289:1760-1762
- (55) Kuruvilla F.G., Shamji A.F., Sternson S.M., Hergenrother P.J., Schreiber S.L. Dissecting glucose signalling with diversity-oriented synthesis and small-molecule microarrays *Nature* 2002 416:653-657

Lebenslauf

Name:

Christoph Dröseler

Anschrift:

10179 Berlin, Wallstr.66

Geburtsort:

Berlin

Geburtsdatum:

18.07.1976

Nationalität:

deutsch

Familienstand:

ledig

Schulbildung:

1983-1991 Friedrich-Wolf-Oberschule, Berlin

1992-1996 John-Lennon-Gymnasium, Berlin

Schulabschluss:

1996 Abitur am John-Lennon-Gymnasium, Berlin

Wehrdienst:

1996-1997 Grundwehrdienst

Studium:

1997-2003 Studium der Zahnmedizin an der Humboldt Universität zu Berlin

Hochschulabschluss:

2003 Staatsexamen, Humboldt-Universität zu Berlin Zentrum für Zahnmedizin

Approbation:

Januar 2004 Approbation als Zahnarzt

Promotionsvorhaben:

Seit Februar 2004 Promotion im Institut für medizinische Immunologie in der Arbeitsgruppe für molekulare Bibliotheken bei Dr. rer. nat. R.Volkmer-Engert zum Dr. med. dent.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. rer.nat. Rudolf Volkmer bedanken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe molekulare Bibliotheken meine Promotionsarbeit schreiben konnte und für die wertvollen Hinweise. Ich danke besonders Frau Christiane Landgraf, Ines Kretzschmas und Frau Dr. rer. nat. Prisca Boiguerin für die hilfreiche Zusammenarbeit. Ganz herzlich möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima in der AG molekulare Bibliotheken bei den Arbeitskollegen bedanken.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne die Hilfe von Dritten angefertigt habe. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig.

Berlin, den 21.11.2005

Christoph Dröseler